

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 68, номер 4, 2021

---

---

## ОБЗОРЫ

- Генная инженерия биосинтеза лигнина в деревьях: компромисс между свойствами древесины и жизнеспособностью растений  
*В. Г. Лебедев, К. А. Шестибратов* 339
- РНК-интерференция в защитных системах растений  
*И. В. Максимов, М. Ю. Шеин, Г. Ф. Бурханова* 356
- 

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- JetGene – интернет-ресурс для анализа регуляторных областей или нуклеотидных контекстов у дифференциально транскрибуемых транскриптов растений  
*Н. С. Садовская, О. Н. Мустафаев, А. А. Тюрин, И. В. Дейнеко, И. В. Голденкова-Павлова* 371
- Состояние антиоксидантной системы и долговременное хранение волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена глутатион-S-трансферазы *ATGSTF11*  
*Х. Г. Мусин, В. В. Федяев, Б. Р. Кулуев* 380
- Получение и характеристика суспензионной культуры клеток *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse – продуцента изофлавоноидов  
*М. В. Титова, Д. В. Кочкин, А. А. Фоменков, И. М. Иванов, Е. А. Котенкова, Г. Л. Кочарян, Э. Г. Дживилишев, Н. П. Мехтиева, Е. В. Попова, А. М. Носов* 392
- Изменение ультраструктуры хлоропластов *Cucumis sativus* L. и *Secale cereale* L. при низкотемпературном закаливании  
*В. Н. Попов, Н. В. Астахова* 402
- Вовлечение нитратредуктазы и оксида азота (NO) в реализацию стресс-протекторного действия донора монооксида углерода (CO) на проростки пшеницы при гипертермии  
*М. А. Шкляревский, Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец, А. А. Луговая, В. П. Бессонова* 412
- Влияние мелатонина и салициловой кислоты на генерацию АФК митохондриями семядолей люпина  
*П. А. Буцанец, Н. А. Шугаева, А. Г. Шугаев* 421
- Уровень перекисного окисления липидов, содержание пероксида водорода и активность супероксиддисмутазы в листьях факультативного САМ-растения *Hylotelephium triphyllum* (Нав.) Holub и  $C_3$ -растения *Plantago media* L. в природных условиях  
*Е. В. Силина, Г. Н. Табаленкова, Т. К. Головки* 430
- 

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Особенности применения  $O_2$ -электродов Кларка в биологических исследованиях  
*В. Б. Бородин* 439
- 
-



УДК 581.1

## ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ БИОСИНТЕЗА ЛИГНИНА В ДЕРЕВЬЯХ: КОМПРОМИСС МЕЖДУ СВОЙСТВАМИ ДРЕВЕСИНЫ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬЮ РАСТЕНИЙ

© 2021 г. В. Г. Лебедев<sup>а, \*</sup>, К. А. Шестибратов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушкино, Россия

\*e-mail: vglebedev@mail.ru

Поступила в редакцию 03.09.2020 г.

После доработки 27.09.2020 г.

Принята к публикации 02.10.2020 г.

Лигнин является вторым по распространенности наземным биополимером. Он обеспечивает механическую прочность растений и водонепроницаемость проводящей системы, а также играет важную роль в защите от биотических и абиотических стрессов. Химическая стойкость лигнина препятствует переработке растительной биомассы в целлюлозу и биотопливо, что привело к интенсификации исследований его биосинтеза. Длительное время считалось, что лигнин состоит почти исключительно из трех монолигнолов, но к настоящему времени обнаружено еще около тридцати минорных мономеров различной химической природы. С помощью методов генной инженерии получено большое количество трансгенных деревьев с измененной экспрессией как генов ферментов биосинтеза лигнина, так и генов факторов транскрипции, регулирующих этот процесс. Изменения в содержании и/или составе лигнина позволили значительно повысить эффективность делигнификации и ферментативного гидролиза древесной биомассы, но это часто приводило к замедлению роста и отклонениям в развитии растений. В поисках баланса между потребностями промышленности и жизнеспособностью растений был предложен ряд новых стратегий, основанных на включении в состав лигнина новых монолигнолов, а также использовании природных форм с дефицитом лигнина. Новые физико-химические свойства лигнина должны повысить его экстрагируемость, но вместе с тем необходимо изучение роста, развития и стрессоустойчивости таких растений в полевых условиях. В обзоре представлено современное состояние исследований по изучению и модификации лигнина в древесных растениях. Кроме того, обсуждается взаимосвязь этих изменений с жизнеспособностью растений и перспективы их коммерческого использования.

**Ключевые слова:** биосинтез лигнина, монолигнолы, транскрипционные факторы, экспрессия генов, трансгенные деревья, биотопливо, фенилпропаноиды

**DOI:** 10.31857/S0015330321030106

### ВВЕДЕНИЕ

Лигнин является вторым по распространенности биополимером в природе после целлюлозы и представляет собой сложное разветвленное соединение из фенилпропаноидных мономеров. Лигнин откладывается в основном в клеточной стенке трахеальных элементов и волокон, а у некоторых видов растений — также в эндодерме, пе-

ридерме и эпидермисе [1]. Физико-химические свойства лигнина (твердость, стойкость, гидрофобность) обуславливают его основные функции в растениях: обеспечение механической прочности и водонепроницаемости сосудов ксилемы. Кроме этого, лигнин как вещество фенольной природы принимает участие в защите растений от различных стрессов [2]. Эти биотические и абиотические стрессы включают засуху, УФ-радиацию, атаки патогенов и вредителей, механические повреждения и др. [3]. Ценные для растений свойства лигнина становятся недостатком при использовании растительной биомассы в качестве сырья. Его удаление в процессе получения бумаги высокзатратно и вредно для окружающей среды [4]. Лигнин снижает эффективность ферментативной переработки биомассы в сбраживаемые сахара для получе-

**Сокращения:** PAL — фенилаланин аммонийлиаза; C4H — циннамат 4-гидроксилаза; 4CL — 4-кумарат КоА-лигаза; HST — шикимат гидроксициннамил трансфераза; C3'H — *n*-кумароил-шикимат-3-гидроксилаза; CSE — кофеил-шикимат эстераза; CCoAOMT — кофеил-КоА-О-метил-трансфераза; F5H — ферулат 5-гидроксилаза; COMT — метилтрансфераза кофейной кислоты; CCR — циннамил КоА-редуктаза; CAD — дегидрогеназа коричневого спирта; TF — транскрипционный фактор; РНКи — РНК интерференция.

ния биотоплива [5]. Наконец, лигнин ухудшает перевариваемость кормов у жвачных животных, так как отрицательно влияет на их микробное расщепление [6]. Синтез лигнина усиливается в ответ на различные стрессы, и не исключено повышение его содержания в растениях в связи с глобальным изменением климата, которое увеличивает вероятность их появления и интенсивность стрессов. В целом, снижение содержания или изменение состава лигнина обеспечивает значительный экономический и экологический выигрыш для различных отраслей промышленности. Очевидно, что достичь этого можно только путем глубокого изучения биосинтеза лигнина на биохимическом и молекулярном уровнях. Хотя подобные исследования интенсивно ведутся и на травянистых растениях – с фундаментальной целью на модельных объектах (арабидопсис, табак) и для практического применения на сельскохозяйственных культурах (люцерна, кукуруза), в данном обзоре рассматриваются лесные древесные породы, главным образом, листовые, так как лигнин в основном определяет характеристики древесины.

## БИОСИНТЕЗ ЛИГНИНА

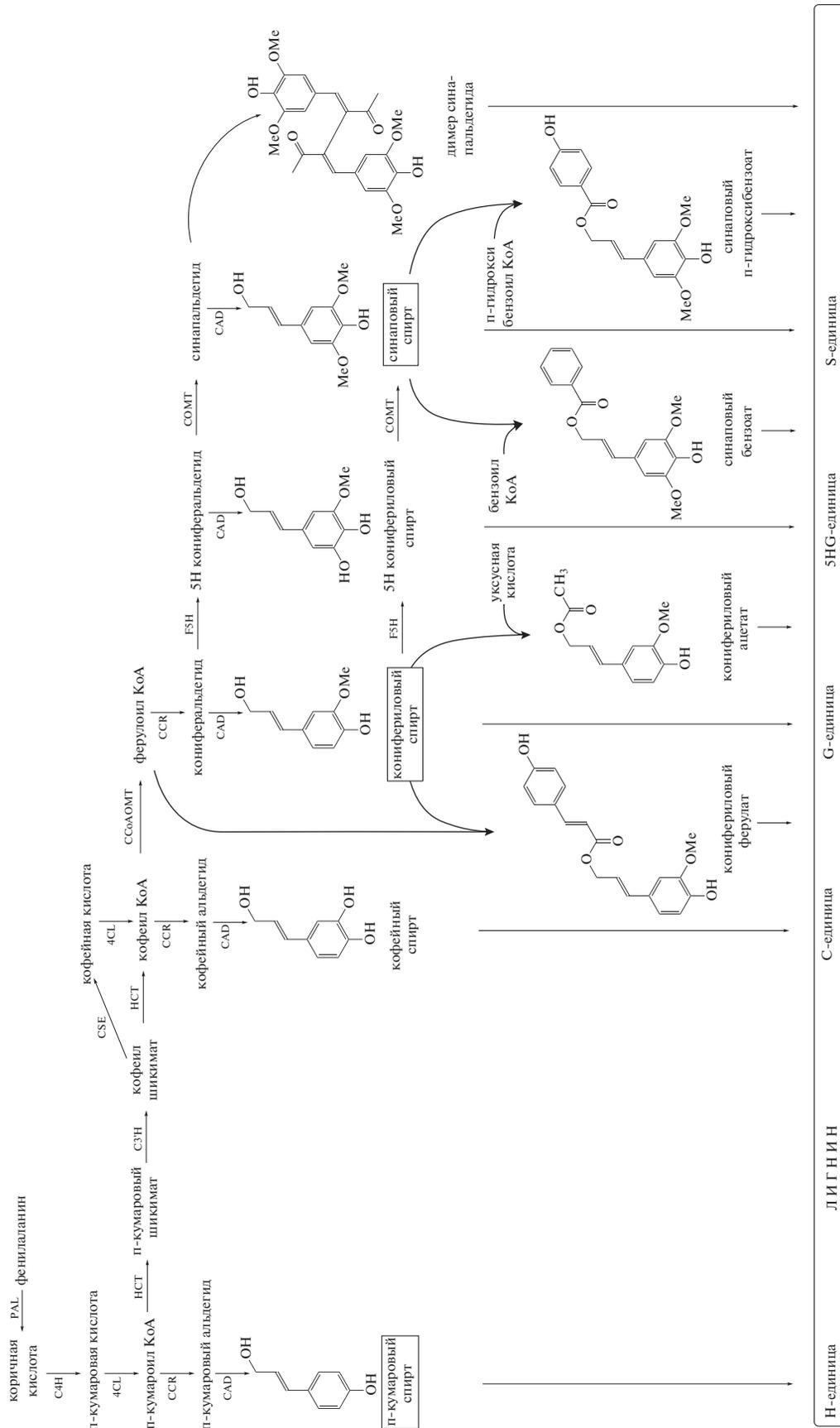
### *Фенилпропаноидный путь метаболизма*

Биосинтез лигнина является частью фенилпропаноидного пути метаболизма и включает три этапа: синтез монолигнолов в цитозоле, их транспорт через плазматическую мембрану и окислительную полимеризацию монолигнолов с образованием макромолекул в клеточной стенке [7]. Синтез монолигнолов изучен достаточно хорошо, и долгое время считалось, что в нем участвует 10 ферментов: фенилаланин аммонийлиаза (PAL), циннамат 4-гидроксилаза (C4H), 4-кумарат КоА-лигаза (4CL), шикимат гидроксициннамоил трансфераза (HCT), *n*-кумароил шикимат 3-гидроксилаза (C3'H), кофеоил-КоА-О-метилтрансфераза (CCoAOMT), ферулат 5-гидроксилаза (F5H), метилтрансфераза кофейной кислоты (COMT), циннамоил КоА-редуктаза (CCR) и дегидрогеназа коричневого спирта (CAD) [8]. Биосинтез начинается с дезаминирования фенилаланина и является общим для всех монолигнолов до образования *n*-кумароил-КоА с участием ферментов PAL, C4H и 4CL (рис. 1). После этого происходит разветвление: к образованию предшественника *n*-гидроксифенильного (H) лигнина ведет самый короткий путь из двух ферментов – CCR и CAD, а к синтезу предшественников гваяцильного (G) и сирингильного (S) лигнинов – фермент HCT. Этот фермент катализирует образование сложного эфира *n*-кумароил шикимата, который служит субстратом для фермента C3'H [7]. Затем ферменты CCoAOMT и CCR катализируют образование кониферилового альдегида, который CAD превращает в конифериловый

спирт (G-лигнин). Еще одним ключевым ферментом регуляции лигнификации является F5H, который отклоняет поток фенилпропаноидов от синтеза G-лигнина в направлении синтеза S-лигнина [9]. Используя в качестве субстратов конифериловые альдегид и спирт, F5H (CAld5H) вместе с COMT образует синаповые альдегид и спирт. Таким образом, для синтеза *n*-кумарового спирта (H-лигнина) требуется только пять ферментов (PAL, C4H, 4CL, CCR и CAD), тогда как для синтеза кониферилового спирта (G-лигнина) – восемь (пять вышеперечисленных плюс HCT, C3'H и CCoAOMT), а для синтеза синапового спирта (S-лигнина) – все десять, включая F5H и COMT [8].

Несколько лет назад общепринятая модель биосинтеза лигнина была пересмотрена и к ней добавили еще один фермент. Исследования показали, что обнаруженный в 2010 г. фермент кофеоил шикимат эстераза (CSE) играет важную роль в биосинтезе лигнина в арабидопсисе [10]. Этот фермент катализировал образование кофеата из кофеоил шикимата, что вместе с активностью 4CL обеспечивало обходной путь (помимо реакции с HCT) получения кофеоил-КоА и в итоге направляло биосинтез от H-лигнина к G- и S-лигнину (рис. 1). Позже было показано участие этого фермента в лигнификации листовых (*Populus tremula* × *P. alba*) [5] и хвойных (*Larix kaempferi*) [11] деревьев. При этом отсутствие генов CSE в некоторых травянистых видах говорит о том, что этот фермент является единственным в пути монолигнолов, чье присутствие обязательно для биосинтеза лигнина [12].

После синтеза монолигнолы транспортируются в апопласт, но этот механизм все еще не полностью понятен – он может осуществляться путем пассивной диффузии или с помощью мембранных транспортеров [12]. Ранее предполагалось, что монолигнолы транспортируются в форме гликозидов, которые перед полимеризацией гидролизуются гликозидазой [8]. Однако эта гипотеза еще не получила убедительных доказательств и гликозиды, вероятно, в большей степени используются как запасующие формы в вакуолях [12]. В апопласте происходит дегидрирование монолигнолов с помощью пероксидаз и лакказ до образования монолигноловых радикалов, которые затем соединяются между собой. Среди связей между монолигнолами в полимере лигнина преобладает алкил-арильная эфирная связь ( $\beta$ -O-4; 50–80%), но также встречаются фенилкумарановая ( $\beta$ -5), резинольная ( $\beta$ - $\beta$ ), дибензодиоксициноновая (5-5), бифенилэфирная (5-O-4) и спиродиеноновая ( $\beta$ -1) связи [13]. Эти связи гораздо сильнее лабильных связей между гликозидами и пептидами в других природных полимерах – целлюлозе и белках. В полимеризации не участвуют ферменты или белки, она является чисто химической реакцией, зависящей от таких физических факторов, как pH,



**Рис. 1.** Современные представления о биосинтезе лигнина в древесных растениях. Названия классических монолигнолов помещены в рамку. PAl – фенилаланин амониолиаза, S4H – циннамат 4-гидроксилаза, 4CL – 4-кумарат КоА-лигаза, HCT – шикимат гидроксинамиоил трансфераза, S3H – *p*-кумароил шикимат 3-гидроксилаза, CSE – кофеоил шикимат эстераза, SCoAOMT – кофеоил-КоА-О-метилтрансфераза, F5H – ферулат 5-гидроксилаза, COMT – метилтрансфераза кофейной кислоты, CCR – циннамил КоА-редуктаза, CAD – дегидрогеназа коричного спирта.

ионная сила раствора и запас субстрата [14]. В результате такого механизма биосинтеза образуется сложный разветвленный биополимер нерегулярного строения, что обуславливает его различные физико-химические свойства и затрудняет деполимеризацию.

Несмотря на сложное строение, лигнин состоит в основном из H-, G- и S-единиц, образующихся из *n*-кумарового, кониферилового и синапового спиртов, соответственно, различающихся только степенью метоксилирования ароматического кольца (рис. 1). Содержание различных мономеров лигнина значительно варьирует в зависимости от таксона, вида, стадии развития, типа ткани и клеток и даже слоя клеточной стенки, также на них влияют факторы развития и стрессы окружающей среды [15]. Известно, что лигнин голосеменных состоит в основном из G-единиц с небольшим количеством H-единиц, тогда как у покрытосеменных преобладают G- и S-единицы, причем у однодольных доля H-единиц выше, чем у двудольных [16]. Состав лигнина оказывает большое влияние на его химическую стойкость и эффективность делигнификации или сахарификации древесной биомассы. Лигнин хвойных древесных пород более устойчив к расщеплению, так как у G-единиц преобладают углерод-углеродные связи  $\beta-5$ ,  $5-5$  и  $\beta-\beta$  [17]. Лигнин лиственных пород содержит единицы S и G в соотношении около 2:1, и обилие эфирных связей  $\beta-O-4$  повышает его реакционную способность [18].

#### Неканонические монолигнолы

Длительное время считалось, что лигнин состоит только из H-, S- и G-единиц, но исследования последних 20 лет показали наличие в его составе и других мономеров, что приводит к еще большему разнообразию физико-химических свойств лигнина. Сейчас известно уже более 30 минорных мономеров [13, 19], но большинство из них у деревьев отсутствует. Из группы гидроксикоричных спиртов, куда входят и классические монолигнолы, в деревьях обнаружен 5-гидроксиконифероловый спирт — в лигнине тополя (*P. tremula* × *P. alba*) [20] и кофейный спирт — в культуре трахеальных элементов *Pinus radiata* [21] (рис. 1). Эти мономеры заместили классические гидроксикоричные спирты, синтез которых снизился из-за подавления экспрессии генов метилтрансфераз: СОМТ — в тополе и ССОАОМТ — в сосне.

Большую группу новых монолигнолов составляют их конъюгаты с ацетатом, ферулатом, *n*-гидроксibenзоатом или *n*-кумаратом. Последние обычны в травянистых растениях, но другие были обнаружены и в деревьях, например, остатки *n*-гидроксibenзоата — в *P. tremula* × *P. alba* с геном F5H [22] (рис. 1). От 7 до 23% ферулатных конъюгатов входило в состав лигнина *P. alba* × *gran-*

*didentata* с геном ферулоил-КоА монолигнол трансферазы (FMT) из *Angelica sinensis*. Конифероловые ферулаты, в отличие от синаповых, были обнаружены в древесине некоторых видов (*Populus*, *Salix*, *Eucalyptus* и *Acer*) — от 0.1 до 3.9% от массы лигнина, но у голосеменных они вообще отсутствовали [23]. У хвойных также отсутствовали и ацетатные конъюгаты, содержание которых в лиственных породах сильно варьировало: доля ацетилированных S-единиц колебалась от 1.1% у эвкалипта до 44.6% у граба, а G-единиц — от 0.8% у осины до 4.9% у эвкалипта [24]. Последними в составе лигнина растений были обнаружены еще два конъюгата монолигнолов: бензоаты и ванилаты в листовых тканях *Phoenix canariensis* [25] и синаповый бензоат в *P. trichocarpa* с подавленной экспрессией генов С4Н и С3'Н [26].

Кроме этого, в состав лигнина могут входить некоторые соединения, образующиеся в результате блокирования этапов его биосинтеза. Например, фермент САД катализирует образование спиртов из альдегидов, и снижение его активности повышает содержание последних в лигнине. Подавление экспрессии гена САД с помощью РНК-интерференции (РНКи) в *P. tremula* × *P. alba* привело к значительному (до 20 раз) увеличению встраивания синапового альдегида в лигнин, но конифероловый альдегид заметно не изменился [27] (рис. 1). В мутантной сосне ладанной (*Pinus taeda*) с активностью САД около 1% от контроля в составе лигнина преобладали единицы дигидрокониферолового спирта (рост с 3 до 30%), но также присутствовали единицы коричных альдегидов (смесь единиц *n*-гидроксикоричного и кониферолового) и единицы бензойных альдегидов (смесь единиц *n*-гидроксibenзальдегида и ванилина) [28].

Определение неканонических мономеров лигнина часто требует дополнительных методов анализа. Например, стандартные протоколы для определения состава лигнина, такие как тиацидолиз и ЯМР, могут не отличать спиртовые мономеры от их ацилированных аналогов, и поэтому конифероловые и синаповые спирты в лигнине обычно просто указывают как единицы G и S, соответственно, независимо от того, ацилированы они или нет [19]. Доля минорных монолигнолов в лигнине обычно низка, но выживание в ходе эволюции растений с такими мономерами позволяет предположить, что они обеспечивают растениям определенные преимущества.

#### Регуляция биосинтеза лигнина

Лигнин растений в основном является компонентом вторичной клеточной стенки, которая образуется только после прекращения роста клетки. Во время ее формирования биосинтез лигнина координируется с биосинтезом целлюлозы и ге-

мицеллюлоз с помощью сложной сети тканеспецифичных транскрипционных факторов (ТФ) [8]. До настоящего времени механизмы регуляции биосинтеза лигнина изучены недостаточно [29]. Регуляторы процесса в основном принадлежат к семействам генов NAC и MYB с преобладанием последних [1]. Регуляция биосинтеза лигнина, в первую очередь, изучалась на арабидопсисе, но у деревьев подавляющую долю биомассы составляет древесина, формирование которой представляет длительный процесс, подверженный сезонным изменениям и различным стрессам окружающей среды. Очевидно, что деревья обладают уникальными регуляторными механизмами лигнификации, отсутствующими у травянистых растений.

Одну из главных ролей в регуляции биосинтеза лигнина играют ТФ из семейства NAC, которые содержат консервативный N-концевой ДНК-связывающий домен с C-концом, имеющим домен активации [30]. ТФ NAC из *P. trichocarpa* (гены PtrWND) выполняли роль ключевых регуляторов и путем связывания с промоторами активировали ряд ТФ следующего уровня (семейства NAC, MYB, “цинковых пальцев”) [31]. В этом исследовании была показана более сложная транскрипционная сеть регулирования биосинтеза вторичной клеточной стенки у деревьев по сравнению с арабидопсисом. Сверхэкспрессия гена NAC PdWND3A в *P. deltoides* увеличила число сосудистых клеток и повысила экспрессию гена F5H1, что привело к увеличению содержания лигнина на 12–13% и соотношения S:G с 1.3 до 1.5 и 2.1 [32].

Гены MYB составляют одно из самых больших семейств ТФ в растениях и регулируют различные биологические процессы. Помимо биосинтеза лигнина, эти ТФ активно участвуют в регуляции биосинтеза флавоноидов – другой части фенилпропаноидного пути, входя в состав транскрипционного комплекса MBW [33]. Большинство активаторов MYB, участвующих в регуляции биосинтеза лигнина, относятся к подсемейству R2R3-MYB, которое характеризуется высококонсервативным N-концевым ДНК-связывающим доменом (домен R2R3-MYB) и сильно варибельным C-концевым доменом активации или репрессии [34]. Например, сверхэкспрессия генов ТФ тополя PtoMYB216 и PtrMYB152 усиливала экспрессию различных генов биосинтеза лигнина в *P. tomentosa* и *P. trichocarpa*, соответственно [1, 35].

Кроме ТФ – активаторов транскрипции генов биосинтеза лигнина, были обнаружены и ТФ-репрессоры. Белок ТФ EgMYB1 из *Eucalyptus gunnii* содержал активный репрессорный мотив в регуляторном домене, и перенос его гена в *P. tremula* × *P. alba* привел к снижению транскрипции генов биосинтеза лигнина и уменьшению его содержания [36]. Трансформация тополя геном PtoMYB156 вызвала значительное падение экспрессии генов биосин-

теза целлюлозы, ксилана и лигнина, что снизило их содержание, а также содержание фенолов и флавоноидов [37].

В целом, сеть транскрипционной регуляции биосинтеза вторичной клеточной стенки у сосудистых растений консервативна и в ней ТФ NAC и MYB (ключевые регуляторы первого и второго уровней, соответственно) активируют нижележащие ТФ и гены биосинтеза [38]. Среди регуляторов третьего уровня преобладают ТФ из семейства MYB, из которых некоторые выступают в качестве репрессоров биосинтеза вторичной клеточной стенки [39]. Построение сложной сети транскрипционной регуляции биосинтеза лигнина в деревьях еще далеко не закончено и постоянно уточняется. Недавно выяснилось, что изоформа 5-енолпируват шикимат 3-фосфат синтазы (EPSPS) из *P. trichocarpa*, имеющая на N-конце мотив спираль-поворот-спираль, кроме канонической функции в биосинтезе шикимата, также активирует экспрессию ТФ MYB021 и фенилпропаноидный путь [40]. В одной из последних работ предлагается четырехуровневая схема, включающая 57 взаимодействий между 17 ТФ и 27 генами-мишенями [41]. Авторы предположили, что регуляция формирования древесины осуществляется не только иерархическими взаимодействиями белок – ДНК, но и взаимодействиями белок – белок в пределах одного уровня. Понимание механизмов регулирования биосинтеза лигнина важно не только для фундаментальной науки, но для разработки стратегий целенаправленного улучшения характеристик древесной биомассы.

#### Особенности “стрессовых” лигнинов

Хорошо известно, что биосинтез лигнина регулируется не только внутренними сигналами развития растения, но и различными внешними факторами, такими как патогены, механические повреждения, ветер, гравитация и др. [9, 29]. Так называемые “стрессовые” лигнины по своей структуре отличаются от лигнинов развития, что предполагает различие и физических свойств, но их изучению уделяется мало внимания [42]. Известно, что в ответ на изменение положения ствола и ветвей в пространстве под действием гравитации деревья изменяют биосинтез лигнина, чтобы заставить их вернуться в нормальное положение, и это приводит к развитию реактивной древесины (reaction wood). У лиственных пород ее называют тяговой древесиной (tension wood), она развивается над наклонной областью ствола и ветвей (в зоне растяжения), характеризуется дифференциацией сосудов в волокна и содержит меньше лигнина с измененным составом [3]. У хвойных такую древесину, расположенную под наклонной областью (в зоне сжатия), называют кренью, или древесиной сжатия (compression wood). Она содержит

меньше целлюлозы и больше лигнина с повышенным уровнем Н-единиц и изменениями в химических связях между мономерами [3]. Кроме этого, реактивная древесина содержит значительно больше  $\beta$ -1,4-галактана как у хвойных, где он является хорошим биохимическим маркером древесины сжатия [43], так и в лиственных породах [44].

Недостаток воды во время засухи вызывает осмотический стресс, и многие исследования показали усиление биосинтеза лигнина в этот период. Имитация засухи на видах эвкалипта увеличила содержание лигнина в базальной зоне ствола *Eucalyptus urograndis* и апикальной зоне ствола *E. globulus*, но в обоих случаях возросло соотношение S:G [45]. Обработка проростков *Leucaena leucocephala* маннитолом и NaCl значительно увеличила содержание лигнина и синтез белка CCR в стеблях, что может играть важную роль в устойчивости к засухе [46]. Наконец, ТФ РтоМУВ170 из *P. tomentosa* не только активировал биосинтез лигнина, но и усиливал устойчивость к засухе через индуцированное темнотой закрытие устьиц [47].

Значительно меньше изучалось влияние на лигнификацию холодового стресса и, главным образом, на травянистых растениях. Холодовая обработка растений нута усилила транскрипцию генов PAL, CAD и лакказ, повысила активность пероксидазы и содержание лигнина [48]. Перенос в растения табака гена фермента SAMS, синтезирующего донора метильных групп для различных молекул, включая лигнины, привел к утолщению клеточной стенки в 3–4 раза и выживанию после 48 ч при 2°C [49]. Таким образом, лигнин, вероятно, участвует в защите растений от холода, но на деревьях подобные работы почти неизвестны.

Растения часто отвечают на атаки патогенных микроорганизмов усилением лигнификации, создавая механический барьер. Например, виды *Eucalyptus* и *Ulmus* с повышенной устойчивостью к грибным заболеваниям отличались от менее устойчивых увеличенным отложением лигнина [3]. Кроме этого, изменение биосинтеза лигнина при инфекции может приводить к увеличению синтеза промежуточных соединений или запускать активацию других защитных механизмов [50]. Таким образом, лигнин играет важную роль в адаптации растений к окружающей среде.

Несмотря на всю важность “стрессовых” лигнинов, молекулярные механизмы, лежащие в основе их биосинтеза, остаются в основном неизвестными [42]. Их структура в значительной степени зависела от типа и интенсивности стресса, а также от вида растения, но все же наблюдались некоторые общие свойства: такие лигнины содержали больше Н-единиц, у которых самый короткий путь биосинтеза, что позволяло растению быстрее реагировать на стресс [42]. Возможно,

различные неканонические мономеры, открытые в лигнинах в последние годы, также принимают участие в защите растений от стрессов. Понимание механизмов биосинтеза “стрессовых” лигнинов позволит изменять содержание и состав лигнинов без ослабления защитных свойств растений.

## ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЛИГНИНА В ДЕРЕВЬЯХ

### Модификация биосинтеза лигнина

В биосинтезе монолигнолов участвует 11 ферментов, и к настоящему времени получено большое количество трансгенных деревьев с подавлением или усилением экспрессии соответствующих генов. Наблюдаемые эффекты в значительной степени зависели от расположения фермента в пути биосинтеза. Общий путь фенолпропаноидов включает три стадии, катализируемые ферментами PAL, С4Н или 4СL, в ходе которых происходит конверсия фенилаланина в *n*-кумароил-коА — предшественника флавоноидов, монолигнолов и фенольных кислот [32]. На деревьях почти не проводились эксперименты с генами первых ферментов — PAL и С4Н. Причина, вероятно, в том, что нарушение их работы вызовет слишком большие изменения в лигнификации, а также в содержании разнообразных низкомолекулярных вторичных соединений, обладающих физиологическими эффектами, что критично для выживания растений. Только в 2010 г. антисмысловая конструкция гена С4Н была перенесена в *P. tremula* × *tremuloides*, что снизило содержание лигнина с 22 до 15% без изменения S:G, уменьшило плотность древесины на 10% и несколько ослабило рост [51]. Значительные изменения были отмечены и при подавлении экспрессии гена С4Н у гибридного эвкалипта: ослабление роста, снижение содержания лигнина с 29.6 до 18.9% и уменьшение соотношения S:G с 2.0 до 1.5 [52].

Значительно больше работ известно с генами фермента 4СL. Антисмысловая конструкция с геном 4СL не изменила содержание лигнина в березе повислой (*Betula pendula*), но у одной линии из трех высота уменьшилась в 2 раза и у всех в 1.5–3 раза снизилась масса корней [53]. У всех линий *P. tremula* × *P. alba* с антисмысловым геном 4СL в полевых экспериментах лигнин снизился умеренно (до 10%), но падение экспрессии 4СL ниже 50% привело к уменьшению биомассы в 3–5 раз и развитию красно-коричневой древесины с измененным химическим составом [54]. Схожие эффекты наблюдались и у голосеменных растений. Сильная супрессия гена 4СL с помощью РНКи у *Pinus radiata* привела к карликовости по типу “бонсай”, увеличению доли Н-единиц с 3.4 до 13.5% и потемнению древесины, что говорит о значительных изменениях в анатомии и химии [55]. Красно-коричневая окраска древесины также

отмечалась у большинства линий осины (*P. tremula*), трансформированных РНКи конструкций на ген 4CL (рис. 2), и максимальное снижение лигнина достигало 23% [56]. Степень развития окраски древесины у этих растений коррелировала со снижением лигнина, и у линий со значительным подавлением экспрессии гена 4CL наблюдалось ослабление роста [57]. Таким образом, подавление активности 4CL часто приводит к значительному ослаблению роста и серьезным физиологическим и морфологическим нарушениям.

От *n*-кумароил-КоА путь монолигнолов разветвляется на биосинтез Н-единиц и общую ветвь для S- и G-единиц (ферменты НСТ, СЗ'Н и ССоАОМТ). У растений *P. grandidentata* × *alba* с РНКи конструкцией на ген СЗН содержание лигнина варьировало в широких пределах – от схожих с контролем (22%) до очень низкого (9%), причем снижение лигнина до 17% не влияло на соотношение S : G (64 : 36), но при низком уровне лигнина резко возросло содержание Н-единиц (Н : S : G = 21 : 19 : 60), причем только за счет G-единиц [58]. У растений линии с минимальным лигнином объем биомассы был ниже в 3 с лишним раза, а сухая масса корней – ниже в 9 раз [59]. Интересно, что подавление активности СЗ'Н привело к значительному накоплению нескольких глюкозидов *n*-кумаровой кислоты, обладающих активностью в отношении грибных патогенов и насекомых-вредителей, что может повысить защитные свойства растений [58]. О резком росте Н-единиц (с 0.5 до 23.8%) сообщалось и для *P. trichocarpa* с РНКи вектором на ген СЗНЗ [26]. Подавление экспрессии гена СЗН у эвкалипта снизило содержание лигнина на 25% и высоту растений с 6 до 2 м [52]. Сравнение РНКи подавления у *P. alba* × *P. glandulosa* экспрессии генов СЗН или НСТ показало снижение уровня лигнина на 30 и 20%, соответственно [60]. Авторы сделали вывод, что подавление НСТ было эффективнее, чем СЗН, за счет значительного повышения механических свойств клеточной стенки. Растения *P. tomentosa* с антисмысловым геном ССоАОМТ после 5 лет в поле демонстрировали снижение лигнина на 10% без каких-либо отклонений в росте [61]. В работе этой же ветви биосинтеза лигнина участвует и недавно открытый фермент CSE. Подавление гена CSE с помощью РНКи у *P. tremula* × *P. alba* снизило содержание лигнина (на 19–25%) и соотношение S : G (с 2.1 до 1.9), а также повысило уровень Н-единиц (с 0.6 до 1.2%) [5]. Трансгенные деревья не отличались по морфологии и скорости роста от контроля, что открывает перспективы использования этого гена в качестве мишени для модификации содержания и/или состава лигнина в растениях.

Фермент ССР катализирует предпоследнюю стадию биосинтеза монолигнолов. Около 5% трансформантов *P. tremula* × *P. alba* с геном ССР

имели карликовый фенотип и погибли еще на стадии *in vitro*, но у остальных не было отклонений в росте, несмотря на снижение уровня лигнина до 50% и то, что у некоторых растений была оранжево-красная окраска древесины [62]. У березы *Betula platyphylla* с подавлением экспрессии гена ССР содержание лигнина существенно не изменилось, но у двухлетних растений неожиданно увеличилась высота до 35%, а масса стеблей возросла в 2.5 раза [63].

Подавление экспрессии генов начала пути биосинтеза обычно изменяет содержание лигнина, а подавление экспрессии генов поздних этапов – его состав. Ферменты F5H и СОМТ регулируют соотношение S- и G-единиц, и сверхэкспрессия гена F5H в *P. tremula* × *P. alba* не изменила содержание лигнина, но повысила долю S-единиц до 97.5% (в контроле 68%) и увеличила соотношение S : G до 38 [22]. Это привело к заметным изменениям структуры лигнина (увеличению линейности и снижению полимеризации), но не повлияло на фенотип растений. Трансформация *P. tremula* × *P. alba* геном СОМТ также почти не изменила содержание лигнина, за исключением одной линии, у которой уровень лигнина снизился на 17% [64]. У этой линии также сильно изменилась структура лигнина: упало содержание S-единиц (с 64–67% до 5–6%) и возросло содержание 5-гидроксигваяцильных единиц (с 1 до 11–12%), но это не привело к изменениям в росте растений.

Фермент САД катализирует последний этап биосинтеза монолигнолов – восстановление *n*-кумарового, кониферилового и синапового альдегидов до соответствующих спиртов и является хорошей мишенью. Подавление активности САД с помощью антисмыслового гена в *P. deltooides* × *P. nigra* незначительно снизило содержание лигнина (с 19.6 до 17.5–18%), но у линий с уровнем активности САД 30% и ниже древесина приобрела светло-красную окраску [65]. У таких растений до полновыны лигнина могло растворяться в щелочи при комнатной температуре, что говорит об аномально высоком содержании свободных фенольных концевых групп. Подавление экспрессии гена САД1 с помощью РНКи в *P. tremula* × *P. alba* не уменьшило биомассу, несмотря на 10% снижение содержания лигнина и серьезные изменения в его составе: значительное увеличение (до 20 раз) встраивания синапового альдегида в лигнин, в том числе и в виде нового соединения – гомодимера [27].

#### Модификация регуляции биосинтеза лигнина

Модификация биосинтеза лигнина проводилась и с помощью генов ТФ. В ряде случаев сверхэкспрессия ТФ МУВ в растениях тополя повышало содержание лигнина, сопровождаемое небольшим ослаблением роста. Так, перенос гена PtrМУВ152



**Рис. 2.** Окраска древесины у растений осины в возрасте 4 месяцев, трансформированных РНКи вектором на ген 4CL: а – Pt (нетрансформированный контроль), б – Pt 4CL 1с, в – Pt 4CL 2с, г – Pt 4CL 3а, д – Pt 4CL 4а.

активировал экспрессию всех генов биосинтеза лигнина, кроме гена F5H2, и повысил содержание лигнина на 10–29% [35], а перенос гена PtoMYB216 увеличил содержание лигнина на 25–43% и вызвал его отложение в обычно нелигнифицированных клетках [1]. Кроме генов ТФ, для регуляции биосинтеза лигнина недавно стали использовать и микроРНК. В *P. tomentosa* ослабление экспрессии микроРНК miR6443, регулирующей экспрессию гена F5H2, увеличило в лигнине долю S-единиц без изменения его содержания, но растения имели лежащий фенотип со сниженной механической прочностью стеблей [66].

В ряде случаев ТФ биосинтеза лигнина участвовали в реакциях растений на внешние воздействия. Трансформация тополя геном EgMYB88 из эвкалипта, представителя отсутствующей у арабидопсиса подгруппы WPS-I из семейства MYB, привела к увеличению соотношения S : G вместе со значительным повышением содержания флавоноидов и фенольных гликозидов, известных своими защитными функциями [34]. Авторы предполагают, этот ген может регулировать в камбии и первых слоях дифференцирующейся ксилемы биосинтез фенилпропаноидных метаболитов, способствуя адаптации формирования древесины к условиям окружающей среды. У тополя обнаружили осмотин-подобный белок PdOLP1, представители семейства которого участвуют в защите от абиотических и биотических стрессов, включая и грибные патогены [67]. Исследования с трансгенными растениями *P. alba* × *P. glandulosa* показали, что PdOLP1 может функционировать как негативный регулятор биосинтеза вторичной стенки и играет важную роль в развитии растений при нормальных и стрессовых условиях.

Недавно был обнаружен механизм управления биосинтезом лигнина, основанный на регуляции активности белка ТФ путем его посттрансляционной модификации – фосфорилирования. ТФ тополя LTF1 связывался с промотором гена 4CL и в нефосфорилированном состоянии подавлял лигнификацию, но под действием внешних факторов, например, поранения, происходило фосфорилирование белка с его последующим разрушением протеасомами, что активировало биосинтез лигнина [29]. Таким образом, этот ТФ регулирует биосинтез лигнина в ответ на факторы окружающей среды. Этот механизм было предложено использовать для предотвращения ослабления роста, часто наблюдаемого при модификации биосинтеза лигнина. Экспрессия гена LTF1 под сосудо-специфичным промотором привела к карликовости и развитию тонкостенных сосудов, а под волоконспецифичным – к снижению содержания лигнина с 22.2 до 12.5% без изменений в росте и развитии растений [16]. Таким образом, была разработана эффективная стратегия точного регулирования биосинтеза лигнина без нежелательных последствий.

### Модификация биосинтеза лигнина с помощью редактирования генома

Технология редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9, которая обеспечивает стабильные мутации потери функций в генах-мишенях, успешно применялась и для модификации биосинтеза лигнина у деревьев. Впервые об этом сообщалось в 2015 г., когда 100% эффективность была достигнута на *P. tremula* × *P. alba* при использовании в качестве мишени генов 4CL1 и 4CL2: у всех линий наблюдалась красно-коричневая окраска древесины [68]. Содержание лигнина в растениях снизилось на 23%, а соотношение S:G – с 1.81 до 1.26. Эффективность этого метода значительно превосходила предыдущие исследования с использованием косупрессии, антисмысловой стратегии или РНКи, где значительные изменения наблюдались только у небольшого числа трансформантов [68]. После 4 лет выращивания в теплице снижение уровня лигнина почти не изменилось и составило 19% [69].

В качестве мишеней для этой технологии использовали и гены ТФ. Мутация в гене ТФ PtoMYB170 из *P. tomentosa*, вызванная с помощью CRISPR/Cas9, снизила содержание лигнина на 8–12% и придавала растениям лежащий фенотип, что указывает на активацию этим геном биосинтеза лигнина [47]. С помощью CRISPR/Cas9 в *P. tremula* × *P. tremuloides* нокаутировали четыре гена NST/SND из семейства ТФ NAC и показали, что они являются ключевыми регуляторами образования вторичной клеточной стенки в волокнах древесины и флоэмы [70].

### ПЛЮСЫ И МИНУСЫ МОДИФИКАЦИИ ЛИГНИНА В ДЕРЕВЬЯХ

Путем генетической модификации биосинтеза лигнина в трансгенных деревьях удалось существенно улучшить эффективность сахарификации – важный показатель пригодности лигноцеллюлозной биомассы для получения биотоплива. У растений *P. trichocarpa* с пониженным лигнином выход сахара был выше вне зависимости от вида предварительной обработки, что указывает на лигнин как основную причину низкой эффективности осахаривания биомассы [71]. Эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы после щелочной обработки биомассы 5-летних растений *P. tomentosa* с антисмысловым геном SCoAOMT составила 67–77% по сравнению с 53–69% у обычных деревьев [61]. Существенное увеличение выхода глюкозы было показано для растений *P. tremula* × *P. alba* с подавленной активностью ферментов CAD [27] или CSE [5].

Работы последних лет показали, что улучшить сахарификацию возможно и с помощью генов ТФ, например, путем подавления экспрессии

микроРНК miR6443 в *P. tomentosa* [66]. На эффективность осахаривания влияла и тканеспецифичность экспрессии встроенных генов: выход глюкозы из биомассы тополя с волокноспецифичным подавлением биосинтеза лигнина был увеличен на 67%, а с сосудистоспецифичным — наоборот, снижен на 65% [16]. Известно, что высокое содержание лигнина отрицательно влияет на сахарификацию, тогда как высокое соотношение S : G — положительно [72]. Для оценки эффекта каждого из этих факторов использовали растения тополя с экспрессией гена ТФ NAC и выяснили, что высокое содержание лигнина доминирует над высоким соотношением S:G [32]. Кроме них, на процесс сахарификации могут влиять и другие факторы: наличие в лигнине неканонических монолигнолов и свободных фенольных групп, количество и структурные особенности ксилана, поражаемость вредителями и патогенами (т.е. присутствие “стрессового” лигнина другого состава) [72].

Положительные результаты были получены и в направлении повышения экстрагируемости лигнина. Щелочная делигнификация (крафт-процесс) древесины выращенных в поле 5-летних растений *P. tremula* × *P. alba* с геном SSR проходила легче, что снизило расход химикатов на 12% [62]. Значительно превосходила обычную древесину по эффективности делигнификации (ниже число Каппа, выше выход и вязкость пульпы) древесина *P. alba* × *P. grandidentata* с геном FMT, содержащая zip-лигнин, названный так по наличию химически лабильных эфирных связей (zips — застежек-молний) [73].

К сожалению, кроме своих достоинств, трансгенные деревья с модифицированным биосинтезом лигнина часто демонстрировали отклонения в росте и развитии, вызванные нарушением его основных функций — обеспечения механической поддержки и водного транспорта. Исследования биомеханики растений *P. tremuloides* с генами 4CL и/или CAld5H показали, что снижение лигнина вызывало уменьшение как модуля упругости, так и прочности на сжатие параллельно волокнам [18]. Значительное снижение содержания лигнина (на 30%) без изменения соотношения S:G в древесине *P. tremula* × *tremuloides* с антисмысловым геном С4Н существенно снизило модуль упругости, вероятно, из-за уменьшения плотности древесины, но не повлияло на прочность на растяжение [51]. Исследования на *P. tremula* × *P. alba* с супрессированным геном CSE показали, что модуль упругости был снижен на 36–53%, а предел прочности — примерно на 15% [74]. Модуль упругости при этом хорошо коррелировал со снижением плотности и содержания лигнина.

Некоторое снижение продуктивности деревьев с уменьшенным содержанием лигнина может быть компенсировано повышением эффективности де-

лигнификации и осахаривания, но так происходит не всегда. Как правило, значительное отставание в росте вызывает изменение активности ферментов С4Н, 4CL, С3'Н, НСТ и ССR, но не F5Н, СОМТ и САD. Ослабление роста обычно связывают с тем, что дефицит лигнина в ксилеме приводит к разрушению клеток и это вызывает коллапс сосудов и нарушение водного транспорта [8, 75]. Кроме того, нарушение биосинтеза лигнина приводит к накоплению промежуточных фенольных соединений, которые могут оказывать токсический эффект сами по себе или в сочетании с другими веществами, а также ингибировать ферменты биосинтеза лигнина или влиять на уровень гормонов [19]. По-видимому, существует определенный предел содержания лигнина, ниже которого рост растений значительно ухудшается: например, полевые испытания трансгенных тополей показали, что снижение лигнина менее чем на 10% не влияет на рост, а на 20% — существенно его замедляет [54].

В ряде исследований была показана прямая связь между снижением содержания лигнина и нарушением водного транспорта. Сильное ингибирование лигнификации клеточной стенки у растений тополя с подавлением активности С3'Н привело к коллапсу ксилемы и ухудшению гидравлической проводимости [59]. В работе Китин с соавт. [4] снижение лигнина до 40% в растениях *P. tremula* × *P. alba* с антисмысловым геном 4CL вызвало ослабление гидравлической проводимости и гибель ветвей в конце сезона, но причиной был не коллапс сосудов, а их блокировка тиллами и отложением фенольных соединений. Выращивание этих же растений с поддержкой показало, что механические нагрузки при сниженном лигнине ухудшают водный транспорт ксилемы [75].

Влияние внешних условий на водный транспорт оценивали в работе Marchin с соавт. [76]: трансгенные деревья *P. trichocarpa*, у которых гидравлическая проводимость составляла 15–25% от контроля, выращивали в горном и более жарком и сухом районах. В сухом районе у деревьев длина побегов и площадь листьев снизилась в 2–4 раза, но в горном рост не изменился и был отмечен неожиданный эффект — снижение потребления воды без ущерба для продуктивности. Таким образом, снижение гидравлической проводимости может использоваться для повышения эффективности использования воды растениями [76].

Исследования показывают необходимость адекватной лигнификации деревьев для механической поддержки ствола и водного транспорта, и через них — для роста и выживания. В условиях глобального изменения климата, приводящего к увеличению продолжительности и интенсивности засушливых периодов, особое значение приобретает гидравлическая проводимость. Возможно, снижение этого параметра из-за изменений

лигнификации в текущих условиях не является критическим, но деревья растут долго, и в будущем усиление водного стресса может ухудшить его до некоего порогового уровня, после которого последует ослабление роста и даже гибель растений от высыхания.

## НОВЫЕ СТРАТЕГИИ МОДИФИКАЦИИ ЛИГНИНА

### *Генно-инженерное изменение состава лигнина*

В целом выяснилось, что несложно получить трансгенные деревья со значительно сниженным содержанием лигнина, но такие растения часто обладают различными дефектами роста и развития, и более перспективным представляется изменение его состава. Новые физико-химические свойства, обусловленные составом лигнина, могут повысить его экстрагируемость и/или уменьшить ингибирующее воздействие на осахаривание лигноцеллюлозной биомассы.

На основе исследований особенностей биосинтеза и биохимии лигнина в различных растениях, включая трансгенные, было предложено несколько стратегий. Одна из них предусматривает изменение соотношения классических мономеров лигнина, а другие – включение в состав новых мономеров, обеспечивающих: а) увеличение химически лабильных связей, б) снижение степени полимеризации, в) снижение гидрофобности, г) ослабление связей с полисахаридами [17, 77]. Первая стратегия основана на том, что увеличение S-единиц в лигнине увеличивает частоту наиболее лабильных β-эфирных связей и одновременно уменьшает частоту связей 5–5 и β–5, что улучшает экстрагируемость [77]. В работе Studer с соавт. [72] на деревьях *P. trichocarpa* с широким диапазоном содержания лигнина (15.7–27.9%) и соотношения S:G (1.0–3.0) было показано, что отрицательное влияние содержания лигнина ослаблялось только при соотношениях S : G > 2.0. Кроме того, лигнин трансгенного тополя с геном F5H, состоящий почти исключительно из S-единиц (97.5%), имел пониженную полимеризацию, так как разветвлению цепи препятствовало замещение мономеров как в 3'-, так и в 5'-положениях ароматического кольца [22].

Неканонические мономеры, предполагаемые для включения в состав лигнина, должны отвечать нескольким условиям. В обязательном порядке они должны эффективно связываться с другими мономерами и кроме этого: а) синтезироваться в достаточных количествах, б) производиться в лигнифицирующих клетках или транспортироваться в них, в) эффективно встраиваться в клеточную стенку [19]. Примерами таких мономеров являются, например, конъюгаты монолигнолов, включение которых в состав лигнина уве-

личивает количество легко расщепляемых эфирных связей, что облегчает его деполимеризацию при щелочной обработке. Экспрессия гена FMT в *P. alba* × *P. grandidentata* привела к образованию так называемого “zip-лигнина” с большим количеством (7–23%) ферулатных конъюгатов монолигнолов, что значительно повысило эффективность осахаривания при слабощелочной обработке [78] и выхода крафт-пульпы [73].

Другим способом является снижение степени полимеризации (укорачивание цепей лигнина). Мономеры с алифатическими или фенольными концевыми группами способны только инициировать или завершать полимеризацию, и повышение их доступности может привести к образованию лигнина с увеличенным числом коротких молекул, то есть лигнина с пониженной степенью полимеризации [79]. Схожим образом остановка полимеризации была достигнута встраиванием в *P. tremula* × *P. alba* гена монолигнол-4-O-метилтрансферазы (МОМТ4) [80]. Это привело к образованию 4-O-метилированных конифероловых и синаповых спиртов, которые не могут включаться в растущий полимер лигнина, что снизило его содержание без изменения фенотипа и повысило эффективность осахаривания на 50–62%.

Наконец, включение в состав гидрофобного по своей природе лигнина гидрофильных мономеров (например, гваяцилглицерина) или мономеров, которые минимизируют количество связей лигнин-полисахарид (например, кофейного спирта), может повысить его растворимость в процессе делигнификации и улучшить доступ ферментов во время гидролиза биомассы [79]. Так как реакции растений на включение в состав лигнина новых мономеров изучены еще недостаточно, применение таких стратегий требует проведения испытаний в полевых условиях для изучения их роста, развития и устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам.

### *Природные мутации и вариации генотипа деревьев*

Другим направлением преодоления отклонений в росте и развитии растений с модифицированным лигнином является использование природных форм, мутантных по биосинтезу лигнина, которые смогли выжить в ходе естественного отбора, что демонстрирует их жизнеспособность. Таких мутантных деревьев известно очень мало. У кукурузы и родственных видов мутации в генах биосинтеза лигнина (*bm* или *bmr*), придающие красно-коричневую окраску центральной жилке листа, известны давно, но только в середине 1990-х гг. сообщили о первом древесном растении с подобной мутацией – сосне ладанной (*Pinus taeda*) [28]. Как и у кукурузы, у сосны мутация была в гене фермента последнего этапа био-

синтеза лигнина CAD, что снизило активность фермента до 1% от нормы и ниже. У сосны, гомозиготной по мутантной аллели *cad-n1*, была коричнево-красная древесина, сниженное содержание лигнина и значительно измененный состав, но доля Н-единиц не изменилась, что указывает на независимый механизм образования *n*-кумарового спирта [28]. Несмотря на значительные изменения состава лигнина, его функции не были нарушены, и мутантные сосны росли нормально.

С помощью секвенирования 768 деревьев из природной популяции *P. nigra* был выявлен мутант, гомозиготный по гену с преждевременным стоп-кодом, кодирующим фермент НСТ, который необходим для синтеза мономеров G- и S-лигнина [81]. У генотипа с дефектным геном содержание лигнина не изменилось, но резко выросло содержание Н-единиц (с 0.4 до 7%) в основном за счет G-единиц, что также повысило соотношение S : G с 1.8 до 2.4, но не вызвало различий по росту и фенотипу [81].

Наконец, недавно было охарактеризовано мутантное дерево шелковицы (*Morus alba*) с понижающими ветвями и необычной красной древесиной, обнаруженное около 1912 г. в Японии [82]. У этого дерева по сравнению с другими сортами шелковицы были снижены содержание лигнина (14.9% и 20.1–22.3%) и соотношение S : G (0.78 и 0.99–1.19). Секвенирование показало в гене CAD вставку гуанина вблизи старт-кодона, что приводило к преждевременному образованию стоп-кодона в аминокислотной цепи фермента [82]. Авторы публикации считают, что одной из причин редкого выявления мутантных по лигнину деревьев является то, что один из признаков мутации — изменение окраски древесины под корой — чрезвычайно сложно идентифицировать.

Из-за уникальности мутантных деревьев более перспективным представляется использование природного генетического разнообразия. Известно, что существует большая разница в количестве и составе лигнина между особями одного и того же вида. Например, из сотни неродственных природных генотипов *Eucalyptus globulus* были отобраны две контрастные группы по 5 растений, различающиеся выходом целлюлозы на 4%, что представляет собой значительный потенциальный выигрыш для промышленности [83]. Изучение природных популяций *P. deltooides*, *P. nigra* и *P. trichocarpa* показало, что содержание лигнина в них колеблется от 14 до 30%, а соотношении S : G — от 1 до 3 [84]. Так как оба этих фактора влияют на эффективность получения целлюлозы и биотоплива, то включение таких генотипов в селекционные программы с применением современных методов, например, маркер-опосредованной или геномной селекции, является многообещающей альтернативой модификации лигнина методами генной инженерии.

## ОЦЕНКА В ПОЛЕ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ ДЕРЕВЬЕВ

По экономическим и правовым причинам большинство исследований с трансгенными деревьями проводится в теплице, хотя именно для деревьев полевые испытания имеют большое значение, т. к. результаты тепличных исследований в основном нельзя экстраполировать на поведение растений в естественных условиях. В теплице деревья не испытывают ежегодную смену циклов периодов покоя и роста, не подвергаются воздействию вредителей и заболеваний, у них нарушается процесс формирования древесины, а также очень сложно оценить стабильность экспрессии перенесенных генов [85]. Лигнин играет значительную роль в стрессоустойчивости, поэтому самые различные стрессовые факторы окружающей среды могут заметно влиять на жизнеспособность растений по сравнению с тепличными условиями. Неоднократно сообщалось о снижении продуктивности деревьев в полевых условиях, например, для растений *P. tremula* × *P. alba* с генами CCR [58]. Кроме того, принципиальные различия в росте и развитии деревьев *P. trichocarpa* с супрессией гена 4CL наблюдались при их выращивании в двух районах, различающихся по температуре и количеству осадков [72].

Вмешательство в метаболизм фенилпропаноидов также может влиять на биосинтез вторичных метаболитов, которые играют важную роль во взаимодействиях растений с окружающей средой. Тем не менее, оценка биобезопасности различных видов из рода *Populus* и березы повислой (*Betula pendula*) в полевых условиях не выявила существенного влияния встраивания генов биосинтеза лигнина на образование эктомикоризы [86], разложение листового опада [49], поражение вредителями или болезнями [87]. В случае обнаружения каких-либо различий по сравнению с контролем они находились в пределах внутривидовой изменчивости для коммерческих сортов [86].

Одним из основных направлений генной инженерии лесных пород, наряду с модификацией лигнина, является повышение их продуктивности, и большой интерес представляет взаимодействие между этими признаками. Многочисленные исследования показали отрицательную корреляцию между содержанием лигнина и биомассой (объемом древесины), которую можно рассматривать как конкуренцию за углерод между основными компонентами древесины — лигнином, с одной стороны, и целлюлозы с гемицеллюлозами — с другой [88]. Полевые испытания гибрида *P. tremula* × *P. alba* с геном глутаминсинтетазы сосны GS1a, обладающего усиленным ростом, не показали изменения уровня лигнина, но соотношение S:G возросло с 1.99 до 2.23 и это привело к улучшению растворения лигнина при щелочной делигнификации древе-

сины [89]. В древесине двулетних растений осины (*P. tremula*) с геном GS1 сосны наблюдали другие изменения: содержание лигнина снизилось на 5–8%, а соотношение S:G – с 2.35–2.40 до 1.95–2.21 [90]. Таким образом, более продуктивные деревья потенциально могут обладать улучшенными характеристиками для производства целлюлозы и биотоплива.

Несмотря на всю важность полевых испытаний, практически невозможно оценить последствия выращивания трансгенных деревьев на некоторые долгосрочные процессы, например, круговорот биофильных элементов, в котором задействовано большое число изменяющихся, причем иногда случайным образом, факторов. Более того, на этот процесс влияет глобальное изменение климата, и все это делает возможным его оценку только с помощью математического моделирования. Впервые подобные исследования с трансгенными деревьями были проведены на осине с геном ксиланглюканазы Xeg и супрессированным геном 4CL [91, 92]. В моделях оценивали влияние трансгенных плантаций для нужд целлюлозно-бумажной промышленности на круговорот углерода и азота, и необратимых изменений не обнаружили. Лигнин является наиболее трудноразлагаемой частью древесины, и изменения его содержания и/или состава могут оказывать влияние на круговорот элементов питания в почве. В связи с этим, моделирование последствий выращивания деревьев с модифицированным лигнином должно стать необходимым элементом оценки биобезопасности таких растений перед их коммерческим применением.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Содержание и состав лигнина в растениях являются основными факторами, влияющими на эффективность производства целлюлозы и биотоплива. Необходимость улучшения этих показателей способствовала значительному прогрессу в нашем понимании биосинтеза лигнина и механизмов регуляции лигнификации, а также влияния лигнина на рост и развитие растений. Эти знания позволили разработать ряд эффективных стратегий по модификации содержания и структуры лигнина, позволяющих не только улучшить характеристики лигноцеллюлозной биомассы с точки зрения ее переработки, но и минимизировать нежелательные последствия таких манипуляций для растений. Тем не менее, модификация лигнина, выполняющего и защитные функции, увеличивает риск ослабления устойчивости растений к экстремальным биотическим и абиотическим стрессам, которые увеличиваются в связи с изменением климата, что может привести к снижению продуктивности и даже к гибели растений. Это особенно важно для древесных расте-

ний, плантации которых закладываются на многие годы или даже десятилетия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-116-50103.

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. Tian Q., Wang X., Li C., Lu W., Li Yang L., Jiang Y., Luo K. Functional characterization of the poplar R2R3-MYB transcription factor PtoMYB216 involved in the regulation of lignin biosynthesis during wood formation // PLoS One. 2013. V. 8: e76369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076369>
2. Загоскина Н.В. Фенольные соединения и их участие в защите растений от стрессовых воздействий // Мат. X Междунар. симп. “Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты”. Москва, 2018. С. 150.
3. Moura J.C., Bonine C.A., Viana J.D.O.F., Dornelas M.C., Mazzafera P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants // J. Integr. Plant Biol. 2010. V. 52. P. 360. <http://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>
4. Kitin P., Voelker S.L., Meinzer F.C., Beekman H., Strauss S.H., Lachenbruch B. Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: a study by cryo-fluorescence microscopy. Plant Physiol. 2010. V. 154. P. 887. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156224>
5. Saleme M.L.S., Cesarino I., Vargas L., Kim H., Vanholme R., Goeminne G., van Acker R., Fonseca F.C.A., Pallidis A., Voorend W., Junior J.N., Padmakshan D., van Doorselaere J., Ralph J., Boerjan W. Silencing caffeoyl shikimate esterase affects lignification and improves saccharification in poplar // Plant Physiol. 2017. V. 175. P. 1040. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00920>
6. Grev A.M., Wells M.S., Samac D.A., Martinson K.L., Sheaffer C.C. Forage accumulation and nutritive value of reduced lignin and reference alfalfa cultivars // Agron. J. 2017. V. 109. P. 2749. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.04.0237>
7. Liu C.-J., Cai Y., Zhang X., Gou M., Yang H. Tailoring lignin biosynthesis for efficient and sustainable biofuel production // Plant Biotechnol. J. 2014. V. 12. P. 1154. <https://doi.org/10.1111/pbi.12250>
8. Bonawitz N.D., Chapple C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype // Annu. Rev. Genet. 2010. V. 44. P. 337. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163508>
9. Al-Haddad J.M., Kang K.-Y., Mansfield S.D., Telewski F.W. Chemical responses to modified lignin composition in tension wood of hybrid poplar (*Populus tremula* × *Populus alba*) // Tree Physiol. 2013. V. 33. P. 365. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt017>

10. Vanholme R., Cesarino I., Rataj K., Xiao Y., Sundin L., Goeminne G., Kim H., Cross J., Morreel K., Araujo P., Welsh L., Hastraete J., McClellan C., Vanholme B., Ralph J. et al. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis* // *Science*. 2013. V. 341. P. 1103. <https://doi.org/10.1126/science.1241602>
11. Wang X., Chao N., Zhang M., Jiang X., Gai Y. Functional characteristics of caffeoyl shikimate esterase in *Larix kaempferi* and monolignol biosynthesis in gymnosperms // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20: 6071. <https://doi.org/10.3390/ijms20236071>
12. Dixon R.A., Barros J. Lignin biosynthesis: old roads revisited and new roads explored // *Open Biol.* 2019. V. 9: 190215. <https://doi.org/10.1098/rsob.190215>
13. del Río J.C., Rencoret J., Gutierrez A., Elder T., Kim H., Ralph J. Lignin monomers from beyond the canonical monolignol biosynthetic pathway: another brick in the wall // *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2020. V. 8. P. 4997. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01109>
14. Ralph J., Brunow G., Harris P.J., Dixon R.A., Schatz P.F., Boerjan W. Lignification: are lignins biosynthesized via simple combinatorial chemistry or via proteinaceous control and template replication? // *Recent Advances in Polyphenol Research* / Eds. Daayf F., Lattanzio V. Wiley- Blackwell Publishing. 2008. V. 1. P. 36. <https://doi.org/10.1002/9781444302400.ch2>
15. Chanoca A., de Vries L., Boerjan W. Lignin engineering in forest trees // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 912. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00912>
16. Gui J., Lam P.Y., Tobimatsu Y., Sun J., Huang C., Cao S., Zhong Y., Umezawa T., Li L. Fibre-specific regulation of lignin biosynthesis improves biomass quality in *Populus* // *New Phytol.* 2020. V. 226. P. 1074. <https://doi.org/10.1111/nph.16411>
17. Mottiar Y., Vanholme R., Boerjan W., Ralph J., Mansfield S.D. Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. V. 37. P. 190. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.009>
18. Horvath L., Peszlen I., Peralta P., Kasal B., Li L. Mechanical properties of genetically engineered young aspen with modified lignin content and/or structure // *Wood Fiber Sci.* 2010. V. 42. P. 310. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.01.002>
19. Vanholme R., De Meester B., Ralph J., Boerjan W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 56. P. 230. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.018>
20. Lu F., Marita J.M., Lapierre C., Jouanin L., Morreel K., Boerjan W., Ralph J. Sequencing around 5-hydroxycinnoferyl alcohol-derived units in caffeic acid O-methyltransferase-deficient poplar lignins // *Plant Physiol.* 2010. V. 153. P. 569. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154278>
21. Wagner A., Tobimatsu Y., Phillips L., Flint H., Torr K., Donaldson L., Pears L., Ralph J. CCoAOMT suppression modifies lignin composition in *Pinus radiata* // *Plant J.* 2011. V. 67. P. 119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04580.x>
22. Stewart J.J., Akiyama T., Chapple C., Ralph J., Mansfield S.D. The effects on lignin structure of overexpression of ferulate 5-hydroxylase in hybrid poplar // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 621. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137059>
23. Karlen S.D., Zhang C., Peck M.L., Smith R.A., Padmakshan D., Helmich K.E., Free H.C.A., Lee S., Smith B.G., Lu F., Sedbrook J.C., Sibout R., Grabber J.H., Runge T.M., Mysore K.S. et al. Monolignol ferulate conjugates are naturally incorporated into plant lignins // *Sci. Adv.* 2016. V. 2: e1600393. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600393>
24. del Río J.C., Marques G., Rencoret J., Martinez A.T., Gutierrez A. Occurrence of naturally acetylated lignin units // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 5461. <https://doi.org/10.1021/jf0705264>
25. Karlen S.D., Smith R.A., Kim H., Padmakshan D., Bartuce A., Mobley J.K., Free H.C.A., Smith B.G., Harris P.J., Ralph J. Highly decorated lignins in leaf tissues of the Canary Island date palm *Phoenix canariensis* // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. P. 1058. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01172>
26. Kim H., Li Q., Karlen S.D., Smith R.A., Shi R., Liu J., Yang C., Tunlaya-Anukit S., Jack P. Wang J.P., Chang H.-M., Sederoff R.R., Ralph J., Chiang V.L. Monolignol benzoates incorporate into the lignin of transgenic *Populus trichocarpa* depleted in C3H and C4H // *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2020. V. 8. P. 3644. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06389>
27. van Acker R., Déjardin A., Desmet S., Hoengenaert L., Vanholme R., Morreel K., Laurans F., Kim H., Santoro N., Foster C., Goeminne G., Légée F., Lapierre C., Pilate G., Ralph J. et al. Different routes for conifer- and sinapaldehyde and higher saccharification upon deficiency in the dehydrogenase CAD // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. P. 1018. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00834>
28. Ralph J., MacKay J.J., Hatfield R.D., O'Malley D.M., Whetten R.W., Sederoff R.R. Abnormal lignin in a loblolly pine mutant // *Science*. 1997. V. 277. P. 235. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.235>
29. Gui J., Luo L., Zhong Y., Sun J., Umezawa T., Li L. Phosphorylation of LTF1, an MYB transcription factor in *Populus*, acts as a sensory switch regulating lignin biosynthesis in wood cell // *Mol. Plant.* 2019. V. 12. P. 1325. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.05.008>
30. Jervis J., Hildreth S.B., Sheng X., Beers E.P., Brunner A.M., Helm R.F. A metabolomic assessment of NAC154 transcription factor overexpression in field grown poplar stem wood // *Phytochemistry*. 2015. V. 115. P. 112. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.013>
31. Zhong R., McCarthy R.L., Lee C., Ye Z.-H. Dissection of the transcriptional program regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 1452. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181354>
32. Yang Y., Yoo C.G., Rottmann W., Winkeler K.A., Collins C.M., Gunter L.E., Jawdy S.S., Yang X., Pu Y., Ragauskas A.J., Tuskan G.A., Chen J.G. PdWND3A, a wood-associated NAC domain-containing protein, affects lignin biosynthesis and composition in *Populus* // *BMC Plant Biol.*

2019. V. 19: 486.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-2111-5>
33. *Lebedev V.G., Subbotina N.M., Maluchenko O.P., Lebedeva T.N., Krutovsky K.V., Shestibratov K.A.* Transferability and polymorphism of SSR markers located in flavonoid pathway genes in *Fragaria* and *Rubus* species // *Genes*. 2020. V.11: 11. <https://doi.org/10.3390/genes11010011>
  34. *Soler M., Plasencia A., Lepikson-Neto J., Camargo E.L.O., Dupas A., Ladouce N., Pesquet E., Mounet F., Larbat R., Grima-Pettenati J.* The Woody-preferential gene EgMYB88 regulates the biosynthesis of phenylpropanoid-derived compounds in wood // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7: e1422.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01422>
  35. *Li C., Wang X., Lu W., Liu R., Tian Q., Sun Y., Luo K.* A poplar R2R3-MYB transcription factor, PtrMYB152, is involved in regulation of lignin biosynthesis during secondary cell wall formation // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2014. V. 119. P. 553.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-014-0555-8>
  36. *Legay S., Sivadon P., Blervacq A.S., Pavy N., Baghdady A., Tremblay L., Levasseur C., Ladouce N., Lapierre C., Séguin A.* EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar // *New Phytol.* 2010. V. 188. P. 774.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03432.x>
  37. *Yang L., Zhao X., Ran L.Y., Li C.F., Fan D., Luo K.M.* PtoMYB156 is involved in negative regulation of phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar // *Sci. Rep.* 2017. V. 7: 41209.  
<https://doi.org/10.1038/srep41209>
  38. *Zhong R., Ye Z.H.* Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis // *Plant Sci.* 2014. V. 229. P. 193.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.009>
  39. *Zhang J., Xie M., Tuskan G.A., Muchero W., Chen J.-G.* Recent advances in the transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in the woody plants // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9: 1535.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01535>
  40. *Xie M., Muchero W., Bryan A.C., Yee K., Guo H.-B., Zhang J., Tschaplinski T.J., Sincin V.R., Lindquist E., Payyavula R.S., Barros-Rios J., Dixon R., Engle N., Sykes R.W., Davis M. et al.* A 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase functions as a transcriptional repressor in *Populus* // *Plant Cell.* 2018. V. 30. P. 1645.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.18.00168>
  41. *Chen H., Wang J.P., Liu H.Z., Li H.Y., Lin Y.-C.J., Shi R., Yang C., Gao J., Zhou C., Li Q., Sederoff R.R., Li W., Chiang V.L.* Hierarchical transcription factor and chromatin binding network for wood formation in black cottonwood (*Populus trichocarpa*) // *Plant Cell.* 2019. V. 31. P. 602.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.18.00620>
  42. *Cesarino I.* Structural features and regulation of lignin deposited upon biotic and abiotic stresses // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 56. P. 209.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.12.012>
  43. *Mast S.W., Donaldson L.A., Torr K., Phillips L., Flint H., West M., Strabala T.J., Wagner A.* Exploring the ultrastructural localization and biosynthesis of  $\beta(1,4)$ -galactan in *Pinus radiata* compression wood // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 573.  
<https://doi.org/10.1104/pp.108.134379>
  44. *Gorshkova T., Mokshina N., Chernova T., Ibragimova N., Salnikov V., Mikshina P., Tryfona T., Banasiak A., Immerzeel P., Dupree P., Mellerowicz E.J.* Aspen tension wood fibers contain  $\beta(1\rightarrow4)$ -galactans and acidic arabinogalactans retained by cellulose microfibrils in gelatinous walls // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 2048.  
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00690>
  45. *Mourasobczak J., Souza U., Mazzafera P.* Drought stress and changes in the lignin content and composition in *Eucalyptus* // *BMC Proc.* 2011. V. 5. P. 103. <http://doi.org/https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S7-P103>
  46. *Srivastava S., Vishwakarma R.K., Arafat Y.A., Gupta S.K., Khan B.M.* Abiotic stress induces change in Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) protein abundance and lignin deposition in developing seedlings of *Leucaena leucocephala* // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2015. V. 21. P. 197.  
<https://doi.org/10.1007/s12298-015-0289-z>
  47. *Xu C., Fu X., Liu R., Guo L., Ran L., Li C., Tian Q., Jiao B., Wang B., Luo K.* PtoMYB170 positively regulates lignin deposition during wood formation in poplar and confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* // *Tree Physiol.* 2017. V. 37. P. 1713.  
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpx093>
  48. *Khaledian Y., Maali-Amiri R., Talei A.* Phenylpropanoid and antioxidant changes in chickpea plants during cold stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 772.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060102>
  49. *Seong E.S., Jeon M.R., Choi J.H., Yoo J.H., Lee J.G., Na J.K., Kim N.Y., Yu C.Y.* Overexpression of S-adenosylmethionine synthetase enhances tolerance to cold stress in tobacco. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 242.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443720020144>
  50. *Gallego-Giraldo L., Pose S., Pattathil S., Peralta A.G., Hahn M.G., Ayre B.G., Sunuwar J., Hernandez J., Patel M., Shah J.* Elicitors and defense gene induction in plants with altered lignin compositions // *New Phytol.* 2018. V. 219. P. 1235.  
<https://doi.org/10.1111/nph.15258>
  51. *Bjurhager I., Olsson A.-M., Zhang B., Gerber L., Kumar M., Berglund L.A., Burgert I., Sundberg B., Salmen L.* Ultrastructure and mechanical properties of *Populus* wood with reduced lignin content caused by transgenic down-regulation of cinnamate 4-hydroxylase // *Biomacromolecules.* 2010. V. 11. P. 2359.  
<https://doi.org/10.1021/bm100487e>
  52. *Sykes R.W., Gjersing E.L., Foutz K., Rottmann W.H., Kuhn S.A., Foster C.E., Ziebell A., Turner G.B., Decker S.R., Hinchee M.A.W., Davis M.F.* Down-regulation of p-coumaroyl quinate/shikimate 3 $\alpha$ -hydroxylase (C3H) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes in the lignin biosynthetic pathway of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* leads to improved sugar release // *Biotechnol. Biofuels.* 2015. V. 8. P. 128.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0316-x>

53. *Seppanen S.K., Pasonen H.L., Vauramo S., Vahala J., Toikka M., Kilpelainen I., Setälä H., Teeri T.H., Timonen S., Pappinen A.* Decomposition of the leaf litter and mycorrhiza forming ability of silver birch with a genetically modified lignin biosynthesis pathway // *Appl. Soil Ecol.* 2007. P. 36. V. 100.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.12.002>
54. *Voelker S.L., Lachenbruch B., Meinzer F.C., Jourdes M., Ki C., Patten A.M., Davin L.B., Lewis N.G., Tuskan G.A., Gunter L., Decker S.R., Selig M.J., Sykes R., Himmel M.E., Kitin P. et al.* Antisense down-regulation of 4CL expression alters lignification, tree growth, and saccharification potential of field-grown poplar // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. P. 874.  
<https://doi.org/10.1104/pp.110.159269>
55. *Wagner A., Donaldson L., Kim H., Phillips L., Flint H., Steward D., Torr K., Koch G., Schmitt U., Ralph J.* Suppression of 4-coumarate-CoA ligase in the coniferous gymnosperm *Pinus radiata* // *Plant Physiol.* 2009. V. 149. P. 370.  
<https://doi.org/10.1104/pp.108.125765>
56. *Shestibratov K., Lebedev V., Podrezov A., Salmova M.* Transgenic aspen and birch trees for Russian plantation forests // *BMC Proc.* 2011. V.5. P. 124.  
<https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S7-P124>
57. *Kovalitskaya Y., Dayanova L., Azarova A., Shestibratov K.* RNA interference-mediated down-regulation of 4-coumarate: coenzyme A ligase in *Populus tremula* alters lignification and plant growth // *Int. J. Environ. Sci. Educ.* 2016. V. 11. P. 12259.
58. *Coleman H.D., Park J.-Y., Nair R., Chapple C., Mansfield S.D.* RNAi-mediated suppression of p-coumaroyl-CoA 3-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 4501.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706537105>
59. *Coleman H.D., Samuels A.L., Guy R.D., Mansfield S.D.* Perturbed lignification impacts tree growth in hybrid poplar—a function of sink strength, vascular integrity, and photosynthetic assimilation // *Plant Physiol.* 2008. V. 148. P. 1229.  
<https://doi.org/10.1104/pp.108.125500>
60. *Zhou X., Ren S., Lu M., Zhao S., Chen Z., Zhao R., Lv J.* Preliminary study of cell wall structure and its mechanical properties of C3H and HCT RNAi transgenic poplar sapling // *Sci. Rep.* 2018. V. 8: 10508.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28675-5>
61. *Wang H., Xue Y., Chen Y., Li R., Wei J.* Lignin modification improves the biofuel production potential in transgenic *Populus tomentosa* // *Ind. Crop. Prod.* 2012. V. 37. P. 170.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.014>
62. *Leple J.-C., Dauwe R., Morreel K., Storme V., Lapierre C., Pollet B., Naumann A., Kang K.-Y., Kim H., Ruel K., Lefebvre A., Joseleau J.-P., Grima-Pettenati J., De Rycke R., Andersson-Gunnera S. et al.* Downregulation of cinnamoyl-coenzyme a reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 3669.  
<http://doi.org/>  
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.054148>
63. *Zhang W.B., Wei R., Chen S., Jiang J., Li H.Y., Huang H.J., Yang G., Wang S., Wei H.R., Liu G.F.* Functional characterization of CCR in birch (*Betula platyphylla* x *Betula pendula*) through overexpression and suppression analysis // *Physiol. Plant.* 2015. V. 154. P. 283.  
<https://doi.org/10.1111/ppl.12306>
64. *Jouanin L., Goujon T., de Nadai V., Martin M.-T., Mila I., Vallet C., Pollet B., Yoshinaga A., Chabbert B., Petit-Conil M., Lapierre C.* Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity // *Plant Physiol.* 2000. V. 123. P. 1363.  
<https://doi.org/10.1104/pp.123.4.1363>
65. *Lapierre C., Pilate G., Pollet B., Mila I., Leple J.-C., Jouanin L., Kim H., Ralph J.* Signatures of cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in poplar lignins // *Phytochemistry.* 2004. V. 65. P. 313.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.11.007>
66. *Fan D., Li C., Fan C., Hu J., Li J., Yao S., Lu W., Yan Y., Luo K.* MicroRNA6443-mediated regulation of ferulate 5-hydroxylase gene alters lignin composition and enhances saccharification in *Populus tomentosa* // *New Phytol.* 2020. V. 226. P. 410.  
<https://doi.org/10.1111/nph.16379>
67. *Li S., Zhang Y., Xin X., Ding C., Lv F., Mo W., Xia Y., Wang S., Cai J., Sun L., Du M., Dong C., Gao X., Dai X., Zhang J., Sun J.* The osmotin-like protein gene PdOLP1 is involved in secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21: e3993.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21113993>
68. *Zhou X., Jacobs T.B., Xue L.J., Harding S.A., Tsai C.J.* Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy // *New Phytol.* 2015. V. 208. P. 298.  
<https://doi.org/10.1111/nph.13470>
69. *Tsai C.-J., Xu P., Xue L.-J., Hu H., Nyamdari B., Naran R., Zhou X., Goeminne G., Gao R., Gjersing E., Dahlen J., Pattathil S., Hahn M.G., Davis M.F., Ralph J. et al.* Compensatory guaiacyl lignin biosynthesis at the expense of syringyl lignin in 4CL1-knockout poplar // *Plant Physiol.* 2020. V. 183. P. 123.  
<https://doi.org/10.1104/pp.19.01550>
70. *Takata N., Awano T., Nakata M.T., Sano Y., Sakamoto S., Mitsuda N., Taniguchi T.* *Populus* NST/SND orthologs are key regulators of secondary cell wall formation in wood fibers, phloem fibers and xylem ray parenchyma cells // *Tree Physiol.* 2019. V. 39. P. 514.  
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpz004>
71. *Min D., Li Q., Jameel H., Chiang V., Chang H.M.* The cellulase mediated saccharification on wood derived from transgenic low-lignin lines of black cottonwood (*Populus trichocarpa*) // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 168. P. 947.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9833-2>
72. *Studer M.H., DeMartini J.D., Davis M.F., Sykes R.W., Davison B., Keller M., Tuskan G.A., Wyman C.E.* Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 6300.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1009252108>
73. *Zhou S., Runge T., Karlen S.D., Ralph J., Gonzales-Vigil E., Mansfield S.D.* Chemical pulping advantages of Zip-lignin hybrid poplar // *ChemSusChem.* 2017. V. 10. P. 3565.  
<https://doi.org/10.1002/cssc.201701317>

74. Özparpucu M., Gierlinger N., Cesarino I., Burgert I., Boerjan W., Reggeberg M. Significant influence of lignin on axial elastic modulus of poplar wood at low microfibril angles under wet conditions // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 4039.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz180>
75. Voelker S.L., Lachenbruch B., Meinzer F.C., Kitin P., Strauss S.H. Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival // *Plant Cell Environ.* 2011. V. 34. P. 655.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02270.x>
76. Marchin R.M., Stout A.T., Davis A.A., King J.S. Transgenically altered lignin biosynthesis affects photosynthesis and water relations of field grown *Populus trichocarpa* // *Biomass Bioenergy.* 2017. V. 98. P. 15.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.013>
77. Mahon E.L., Shawn D Mansfield S.D. Tailor-made trees: engineering lignin for ease of processing and tomorrow's bioeconomy // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 56. P. 147.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.10.014>
78. Wilkerson C. G., Mansfield S. D., Lu F., Withers S., Park J.-Y., Karlen S.D., Gonzales-Vigil E., Padmakshan D., Unda F., Rencoret J., Ralph J. Monolignol ferulate transferase introduces chemically labile linkages into the lignin backbone. *Science.* 2014. V. 344. P. 90.  
<https://doi.org/10.1126/science.1250161>
79. Vanholme R., Morreel K., Darrah C., Oyarce P., Grabber J.H., Ralph J., Boerjan W. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops // *New Phytol.* 2012. V. 196. P. 978.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04337.x>
80. Cai Y., Zhang K., Kim H., Hou G., Zhang X., Yang H., Feng H., Miller L., Ralph J., Liu C.-J. Enhancing digestibility and ethanol yield of *Populus* wood via expression of an engineered monolignol 4-O-methyltransferase // *Nat. Commun.* 2016. V. 7: 11989.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms11989>
81. Vanholme B., Cesarino I., Goeminne G., Kim H., Marroni F., Van Acker R., Vanholme R., Morreel K., Ivens B., Pinoso S., Morgante M., Ralph J., Bastien C., Boerjan W. Breeding with rare defective alleles (BRDA): a natural *Populus nigra* HCT mutant with modified lignin as a case study // *New Phytol.* 2013. V. 198: 765.  
<https://doi.org/10.1111/nph.12179>
82. Yamamoto M., Tomiyama H., Koyama A., Okuizumi H., Liu S., Vanholme R., Goeminne G., Hirai Y., Shi H., Takata N., Ikeda T., Uesugi M., Kim H., Sakamoto S., Mitsuda N. et al. A century-old mystery unveiled: Sekizaisou is a natural lignin mutant // *Plant Physiol.* 2020. V. 182. P. 1821.  
<https://doi.org/10.1104/pp.19.01467>
83. Elissetche J.P., Valenzuela S., García R., Norambuena M., Iturra C., Rodríguez J., Mendonça R.T., Balocchi C. Transcript abundance of enzymes involved in lignin biosynthesis of *Eucalyptus globulus* genotypes with contrasting levels of pulp yield and wood density // *Tree Genet. Genom.* 2011. V. 7. P. 697.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-011-0367-5>
84. Tuskan G.A., Muchero W., Tschaplinski T.J., Ragauskas A.J. Population-level approaches reveal novel aspects of lignin biosynthesis, content, composition and structure // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 56. P. 250.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.017>
85. Лебедев В.Г., Муратова С.А., Шестибратов К.А. Полевые испытания и коммерциализация биотехнологических форм лесных древесных растений // *Лесоведение.* 2015. № 5. С. 388.
86. Danielsen L., Lohaus G., Sirrenberg A., Karlovsky P., Bastien C., Pilate G., Polle A. Ectomycorrhizal colonization and diversity in relation to tree biomass and nutrition in a plantation of transgenic poplars with modified lignin biosynthesis // *PLoS One.* 2013. V. 8: e59207.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059207>
87. Pilate G., Guiney E., Holt K., Petit-Conil M., Lapierre C., Leple J. C., Pollet B., Mila I., Webster E.A., Marstorp H.G., Hopkins D.W., Jouanin L., Boerjan W., Schuch W., Cornu D., Halpin C. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 607.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0602-607>
88. Novaes E., Kirst M., Chiang V., Winter-Sederoff H., Sederoff R. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. P. 555. <http://doi.org/>  
<https://doi.org/10.1104/pp.110.161281>
89. Coleman H.D., Canovas F.M., Man H., Kirby E.G., Mansfield S.D. Enhanced expression of glutamine synthetase (GS1a) confers altered fibre and wood chemistry in field grown hybrid poplar (*Populus tremula* X *alba*) (717-1B4) // *Plant Biotechnol. J.* 2012. V. 10. P. 883.  
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00714.x>
90. Лебедев В.Г., Фасхиев В.Н., Белый В.А., Шестибратов К.А. Определение состава лигнинов в трансгенных растениях осины с геном глутаминсинтазы GS методом двумерного ЯМР // *Мат. IX Междунар. симп. "Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты"*. Москва, 2015. С. 342.
91. Комаров А.С., Чертов О.Г., Быховец С.С., Припутина И.В., Шанин В.Н., Видягина Е.О., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Воздействие осинового плантация с коротким оборотом рубки на биологический круговорот углерода и азота в лесах бореальной зоны: модельный эксперимент // *Мат. биол. и биоинф.* 2015. Т. 10. С. 398.  
<https://doi.org/10.17537/2015.10.398>
92. Лебедев В.Г., Ларионова А.А., Быховец С.С., Шанин В.Н., Комаров А.С., Шестибратов К.А. Моделирование биогеохимических циклов азота и углерода на лесных плантациях с трансгенными деревьями // *Мат. Всерос. конф. с междунар. участием "Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений"*. Москва, 2015. С. 415.

## РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМАХ РАСТЕНИЙ

© 2021 г. И. В. Максимов<sup>а, \*</sup>, М. Ю. Шеин<sup>а</sup>, Г. Ф. Бурханова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, Россия

\*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 29.09.2020 г.

Принята к публикации 02.10.2020 г.

Вредители и патогены, в том числе и вирусы, ограничивают биологический потенциал сельскохозяйственных растений, что представляет огромную угрозу продовольственной безопасности. На современном этапе разрабатываются методы защиты растений, основанные на естественном системном и клеточном фитоиммунитете, где особое место занимает уникальный механизм, описываемый термином РНК-интерференция (РНКи). Он формирует один из “эшелонов” одновременно эволюционно консервативного и высоко видоспецифичного фитоиммунитета. В обзоре обсуждается роль малых некодирующих РНК и белков DCL, AGO и RDR, вовлеченных в механизм РНКи, в инфицировании фитопатогенами, вирусами, вредителями и перспективы использования этого феномена при создании препаратов для защиты растений от болезней и вредителей, в том числе с применением метода искусственного отключения генов, описываемого как спрей-индуцированный генный сайленсинг (СИГС, spray induced gene silencing, SIGS).

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, фитоиммунитет, DCL, AGO, RDR

**DOI:** 10.31857/S0015330321030131

### ВВЕДЕНИЕ

РНК-интерференция (РНКи) — одно из выдающихся открытий в биологии, документально подтвержденное в 1998 г. Э. Файром и К. Меллоу с использованием в качестве объекта исследования нематоды *Caenorhabditis elegans* [1]. Механизм РНКи присутствует практически у всех живых организмов и управляет активностью генов посредством формирования коротких двуцепочечных РНК (дцРНК) и синтеза специальных рибонуклеаз (РНКаз), индуцирующих селективную деградацию целевых РНК (вирусных, информационных, транспозонных) и/или ингибирование их трансляции или репликации. На первом этапе целевые дцРНК синтезируются РНК-зависимыми РНК

полимеразами (RNA-dependent RNA polymerase, RdR) из исходной одноцепочечной молекулы РНК (вирусная или информационная РНК, транскрибированная с ДНК и кодирующая тот или иной целевой белок, или РНК, транскрибированные с ДНК транспозона и пре-микроРНК, содержащие специфические “шпилечные” структуры).

Функция RdR в защите растений от вирусов состоит в образовании репликативной вирусной дцРНК, которая, взаимодействуя с белками DCL, индуцирует свою специфическую деградацию [2]. Низкий уровень экспрессии *StRdR* в растениях картофеля *Solanum tuberosum* сопровождался накоплением вируса картофеля Y [3]. Точно так же, в мутантных по гену *rdr1* растениях табака *Nicotiana benthamiana* многократно повышался титр вирусов и, соответственно, снижалась вирусоустойчивость [4], а растения, трансгенные по гену *MtRdR1* от люцерны *Medicago truncatula*, были устойчивы к вирусу табачной мозаики [4]. Вместе с тем есть данные, что подавление экспрессии гена *StRdR1* значительно не влияло на устойчивость растений картофеля *S. tuberosum* к вирусам X и Y [5].

Уровень транскриптов гена *AtRdR1* был выше в растениях *A. thaliana*, предварительно обработанных салициловой кислотой (СК), тогда как ген *AtRdR2* не был чувствителен к ней [4]. Ген *StRdR1*

**Сокращения:** РНКи — РНК-интерференция; дцРНК — двуцепочечные РНК (double-strand RNA, dsRNA); оцРНК — одноцепочечные РНК (single-strand RNA, ssRNA); siRNA — короткие интерферирующие РНК (small interference RNA); ta-siRNA — влияющие на транскрипцию siRNA (trans-acting siRNA); ВП-siRNA — вирус-производные (virus-derived) siRNA; RdDM — РНК-зависимые ДНК-метилазы (RNA-directed DNA methylase), RISC — RNA-induced silencing complex; RITS — RNA-induced transcriptional silencing complex; ВТМ — вирус табачной мозаики; YBK — Y вирус картофеля; ВОМ — вирус огуречной мозаики; ХИГС — хозяин-индуцированный генный сайленсинг; СИГС — спрей-индуцированный генный сайленсинг; СПУ — системная приобретенная устойчивость; нт — нуклеотидные остатки.

*S. tuberosum* показал высокую чувствительность к СК [5]. В растениях перца *Capsicum annuum* экспрессия гена *CaRdR1* стимулировалась под влиянием СК, абсцизовой кислоты (АБК), пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и инфицирования ВТМ, а его глушение индуцировало в растениях восприимчивость к вирусу [6]. Совместная обработка ВТМ и СК растений томатов *Solanum lycopersicum* способствовала накоплению в них транскриптов *SlRdR1* и *SlRdR2* [7]. Точно также, обработанные СК трансгенные растения табака *N. benthamiana*, накапливающие белок MtRdR1, обладали устойчивостью к ВТМ [4]. Анализ *in silico* промоторной части генов семейства *RdR1-6* различных видов растений показал, что основными их транскрипционными факторами являлись белки MYB44, AS1/AS2 и WRKY1 [8]. Подавление экспрессии *NaRdR1*, *NaRdR2*, но не *NaRdR3* повышало восприимчивость растений табака *Nicotiana attenuata* к грибу *F. brachygibbosum* [9].

Белок RdR6 вовлечен в систему вирусоустойчивости. Так, линии табака, экспрессирующие ген *RdR6*, были устойчивы к YBK, а линии риса *Oryza sativa* с подавленной экспрессией этого гена, напротив, восприимчивы к вирусам китайской полосатой мозаики пшеницы, карликовости риса и полосатой хлоротичности риса [10]. В дефицитных по СК растениях табака *N. benthamiana* N1bV3 NahG, а также двойных мутантах N1bV3 NahG/RdR6i, наблюдался высокий уровень транскриптов генов потивируса шарки сливы, что говорит о важности этой сигнальной молекулы, а также продукта гена *RdR6* в защите растений от вирусной инфекции [11]. Обнаружено, что с белком RdR6 связан механизм замалчивания экспрессии генов, кодирующих рецепторные Tull-подобные нуклеотид-связывающие лейцин-богатые белки (nucleotide binding leucine rich repeat, NB-LRR), а также ряда PR-белков, срабатывание механизма, запускаемого патогеном (pathogen-triggered immunity, PTI) и/или элиситором иммунитета (effector-triggered immunity, ETI) посредством генерации влияющих на транскрипцию siRNA (ta-siRNA, trans-acting siRNA) и устойчивости к бактериальной инфекции [12]. Белок RdR6 запускает РНК-зависимое ДНК-метилирование в транскрибируемых регионах ДНК транспозонов, и приводит к эпигенетическому замалчиванию целевых генов, чего RdR2 не может осуществить. Нокаут-мутанты по гену *rdR6* *S. lycopersicum* и *A. thaliana* были восприимчивы к бактериям *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas oryzae*, соответственно [13]. Выявлено, что белок RdR6 накапливается в растениях под влиянием эффектора avrRpt2 бактерии *P. syringae*. С его участием образуются длинноцепочечные siRNA-1 (bacterial-induced siRNA-1) и ассоциированный с siRNA естественный антисмысловый транскрипт (NAT) (natural antisense transcript (NAT)-associated siRNAs), являющийся одним из ключевых в регу-

ляции устойчивости растений к бактериальной инфекции.

Далее, длинные дцРНК, синтезированные RdR, узнаются рибонуклеазами III-го класса, называемыми Dicer- (у позвоночных животных) или Dicer-подобные (Dicer-like, DCL) белки (у растений, грибов и низших беспозвоночных животных), и разрезаются на короткие дцРНК (20–25 нт). DCL белки растений – это многодоменное семейство РНКаз III класса (RNaseIII), инициирующее процессинг дцРНК [3]. Косвенным подтверждением участия белков DCL в иммунитете растений и общей физиологии может служить их разнообразие и нежизнеспособность линий растений, нокаут-мутантных по белку DCL, в особенности DCL1. Предполагается, что современное многообразие этой группы белков в растениях, состоящее из четырех типов белков DCL (*A. thaliana*), эволюционировало в связи с необходимостью развития фитозащитных систем от различных вирусов, патогенов и вредителей [14].

Имеются данные о роли DCL в обеспечении устойчивости растений к вирусным патогенам, защите от транспозонов, супрессии амплификации вирусов/виридов, регуляции экспрессии собственных генов, репрессии трансгенов [14], что позволяет использовать их в трансгенезе для придания растениям устойчивости к вирусам/виридам. Показана дифференциальная последовательная активация генов *VvDCL1* и *VvDCL3* у винограда *Vitis vinifera* L. при грибном патогенезе [15]. Если белок DCL4 запускал локальную РНКи, то для системного развития защитного ответа необходимо было сочетание продуктов экспрессии генов и *DCL2*, и *DCL4* [16]. Вместе с тем, при обработке СК мутантные по генам *Atdcl2*, *Atdcl3* и *Atdcl4* растения *A. thaliana* не становились устойчивыми к вирусу огуречной мозаики (ВОМ) и вирусу табачной мозаики (ВТМ) [17]. Тем не менее, обработка СК растений томатов *S. lycopersicum* и последующее их инфицирование ВТМ способствовало накоплению белков DCL1 и DCL2 [18]. Подавление экспрессии *NaDCL3*, но не *NaDCL2/4*, усиливало восприимчивость *N. attenuata* к грибу *Fusarium brachygibbosum* [9]. В противовирусной защите растений белки DCL4 опосредуют подавление репликации вирусной РНК [3, 19]. Показано, что в ходе эволюции механизмов РНКи происходило усиление сродства к вирусной РНК именно белков DCL4 в сравнении с другими DCL [19].

Особую роль в РНКи играют белки Argonaute (AGO), представляющие один из основных каталитических компонентов РНК-индуцируемого комплекса выключения генов (RNA-induced silencing complex, RISC), а также РНК-индуцируемого транскрипционного сайленсинга (RNA-induced transcriptional silencing complex, RITS), обеспечивая протекание, соответственно, пост-транскрипци-

онного (PTGS, post-transcriptional gene silencing) и транскрипционного (TGS, transcriptional gene silencing) замолкания генов [20].

Основная функция белков AGO в растениях — связывание siRNA и miRNA, генерируемых с участием DCL белков, а также их использование в качестве “направляющего” при узнавании и последующем расщеплении РНК генов-мишеней на транскрипционном, пост-транскрипционном и трансляционном уровнях. Антивирусные свойства растительных белков AGO обобщены в обзорной работе Carbonell и Carrington [21]. Продукты генов *AtAGO1*, *AtAGO2*, и *AtAGO7* *A. thaliana* вовлечены в вирусостойчивость [16, 22]. Показано активное участие белков AGO1 и AGO7 в защите турнепса *Brassica rapa* subsp. *rapifera* от вируса морщинистости листьев [23]. Белок NbAGO2 в растениях *N. benthamiana* — важный компонент, придающий устойчивость к вирусам кольцевой пятнистости [24], кустистой карликовости [25] и мозаики томатов [26]. Белки AGO2 *A. thaliana* были более эффективны против X вируса картофеля в сравнении с аналогичным геном из растений *N. benthamiana* [27]. Показана важность белка AGO4 в устойчивости растений к ВОМ и PVX, а мутанты по гену *ago4* оказывались, кроме того, восприимчивыми к вирусу погремковости табака и вирусу скручивания листьев свеклы [28]. Точно также белок AGO4 оказался важным в формировании защитной системы у растений *N. attenuata* к грибу *F. brachygybbosum*, а замалчивание его синтеза нарушало работу жасмоновой сигнальной системы [9]. Обнаружено, что такое нарушение происходит вследствие отключения синтеза жасмоновой кислоты (ЖК) и устойчивость растений к грибу восстанавливается после обработки растений ЖК.

Белки AGO1 позиционируются как “первый эшелон” защиты, подвергающийся воздействию вирусных супрессоров, а белки AGO2 как следующая линия, нарушающая накопление вируса и находящаяся под совместным контролем белка AGO1 и miR403 [29]. Функции белка AGO2 могут быть исполнены белком AGO5 при нарушении синтеза. Но двойной мутант *ago2ago5* проявлял большую восприимчивость к вирусам по сравнению с мутантами *ago2* или *ago5* по отдельности [27]. В инфицированных вирусом курчавости риса растениях *O. sativa*, помимо транскриптов генов *OsAGO1* и *OsAGO3*, наблюдалось накопление транскрипта гена *OsAGO18*. Предполагается, что кодируемый данным геном продукт играет важную роль в вирусостойчивости и способствует эффективной экспрессии гена *OsAGO1* [30]. Белок AGO4 — необходимый компонент РНК-связанного ДНК-метилирования при формировании устойчивости *S. lycopersicum* к штамму бактерии *P. syringae* DC3000 [31].

Выявлена важная роль miR403a в процессе индуцированного СК накопления транскриптов гена *NbAGO2* [26]. Показано, что белки AGO2 вместе с miR393b необходимы для регуляции устойчивости растений *A. thaliana* к бактерии *P. syringae* pv. *tomato*, проявляющейся в регуляции синтеза белка MEMB12, семейства N-этилмалеимид-чувствительных белков (SNARE), локализованного в аппарате Гольджи и ответственного за секрецию в апопласт патоген-индуцируемых белков, например, PR-1 [18].

Самыми главными исполнителями РНКи в растениях, без которых вся описанная выше защитная система не работает, являются малые некодирующие РНК, которых в растениях содержится 3 класса: а) 21–22 нт малые интерферирующие РНК (siRNA, small interfering RNA); б) 20–24 нт микро РНК (miRNA, micro RNA); в) 24 нт ассоциированные с повторами siRNA (rasiRNA, repeat-associated siRNA) [32]. Комплементарные цепи дцРНК, взаимодействующие с RISC или RITS, названные siRNA и miRNA, являются основными компонентами, связывающимися с целевой (чужеродной или хозяйской) РНК и препятствующими дальнейшему её функционированию (цепь РНК разрезается или нарушается процесс трансляции). При этом, 21–22 нт siRNA участвуют в непосредственной деградации вирусной РНК и некоторых эндогенных мРНК, важных в защитной системе против вирусов [33], а 24 нт rasiRNA уникальны для растений и участвуют в РНК-направленном метилировании ДНК, что необходимо для поддержания стабильности генома через глушение экспрессии транспозонов и повторяющихся последовательностей ДНК [34].

Биогенез многих малых РНК расшифрован и досконально описан [35], но основное внимание исследователей при этом, как правило, уделяется miRNA, накапливающимся в растениях в ответ на стрессовые факторы среды, включая и биотические. Считается, что miRNA является важным компонентом, вовлеченным в хозяин-индуцированный генный сайленсинг (ХИГС, host-induced gene silencing (HIGS)) [36]. Среди них специфическую роль в растениях при формировании иммунитета к патогенам различной этиологии играли изменения в уровне miR160a, miR396a, miR398b, miR482, miR1444, miR2118 и miR7695, мишенью которых были информационные РНК, ответственные за синтез транскрипционных факторов, рецепторных белков NB-LRR, белков системы РНКи, а также ферментов про-/антиоксидантной системы, регулирующих уровень активных форм кислорода [35]. Растения *S. tuberosum*, как гиперэкспрессирующие miR160, так и с подавленным ее уровнем, проявляли крайнюю степень восприимчивости к возбудителю фитофтороза, что предполагает регуляторную роль этой miRNA [37]. Выработка miR159 и miR166, а также их экс-

порт в клетки гриба *Verticillium dahliae* в растениях хлопчатника в ответ на инфицирование коррелировали с формированием у растений устойчивости к грибу [38]. Имеющая гомологию с участком гена, кодирующего транскрипционный фактор AP2/ERF, miR172 идентифицирована как регулятор устойчивости растений томатов к оомицету *Phytophthora infestans* [39]. Точно так же, растения *A. thaliana* секретируют во внеклеточную среду siRNA в составе везикулярных пузырьков, направляющихся в места инфицирования для подавления экспрессии генов вирулентности гриба *Botrytis cinerea* [40]. Секретция в растениях таких внеклеточных везикул происходит не только в ответ на инфицирование, но и при абиотических стрессовых воздействиях, а также при фитогормональном воздействии, предполагая врожденный характер работы механизма РНКи на внешние воздействия. Соответственно, такой транспорт РНК в экзосомах можно будет в будущем использовать при разработке методов доставки siRNA или miRNA к месту инфицирования.

Показана важная роль как сенс-, так и анти-сенс-последовательностей miR393b в регуляции развития устойчивости растений *A. thaliana* к бактерии *P. syringae* pv. *tomato*, регулирующей экспрессию белка MEMB12 из семейства SNARE. Подавление синтеза белка MEMB12 в мутантных растениях, накапливающих miR393\* и ген AGO2, индуцирует экзоцитоз белков PRI. Комплементарная цепь miR393 также вносит вклад в анти-бактериальные реакции, взаимодействуя с белком AGO1 [18]. MiR393 подавляет экспрессию мРНК, кодирующих F-box ауксиновые рецепторы TIR1, AFB2 и AFB3, обычно способствующих экспрессии генов ауксинового ответа. Полученные на паре комплементарных фрагментов miRNA\*/miRNA и белков AGO1 и AGO2 результаты – наглядный пример эффективного функционирования иммунитета растений на базе РНКи [18].

Особую, тонко настроенную и мультифункциональную роль в регуляции устойчивости растений к вирусной [41], бактериальной и грибной [42] инфекциям выполняют изоформы miR168. Обнаружено, что предсказанной мишенью 21-нт miR168 является белок Argonaute (AGO1), что доказывается накоплением свободных мРНК-мишени в мутантах с дефектами гена *ago1* [20]. Вместе с тем, в инфицированных растениях томбусвирусный белок-супрессор сайленсинга P19, проявляющий высокое сродство к 21-нт изоформе miR168, препятствует ее взаимодействию с AGO1 и снижает фитоиммунный ответ [41]. В растениях риса *O. sativa*, инфицированных гемибактериальным грибом *Magnaporthe oryzae*, miR319 проявлял комплементарность по отношению к ключевому ферменту синтеза ЖК – липоксигеназе, что супрессировало ее синтез и снижало устойчивость растений [43]

Интерес представляют данные по регуляции экспрессии защитных генов семейством генов miR482, являющихся исключительными по своему происхождению и нацеленными на нуклеотид-связывающий домен белков NB-LRR [44]. Регуляция активности NB-LRR генов с помощью miRNA, например, miR482f, miR825\* и miR5300, драматически отражается на формировании иммунитета растений [35]. При бактериальной инфекции уровень этих miRNAs снижен [45]. Обнаружено подавление базальной и RPS5-опосредованной устойчивости растений *Arabidopsis* к бактерии *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 посредством контроля экспрессии генов NB-LRR при совместном накоплении в тканях белка RDR6 и miR472 [46]. Выдвигаются предположения, что РНКи, опосредованная miR482/2118, может служить сенсором патологического процесса и настройщиком фитоиммунного ответа [30].

Система РНКи отличается консервативностью и чрезвычайной разборчивостью: каждая распознает и “замалчивает” только свою, целевую РНК. Механизм РНКи играет важную роль в регуляции развития, эпигенетической модификации и в ответных реакциях растений при воздействии различных стрессовых факторов [47], в том числе фитопатогенной природы [40]. Фундаментальная защитная роль механизма РНКи, в первую очередь, проявляется в формировании уникальной естественной защитной стратегии растительного организма против вирусов, патогенов различной природы и даже вредителей и описывается как ХИГС. Поскольку РНКи – продукт совместного эволюционного развития организмов, этот эффективный защитный инструмент может успешно преодолеваться патогенами, в том числе и вирусами [40].

**Супрессия хозяйской РНКи.** Как и все защитные системы, механизм РНКи не безупречен. Он может успешно “ломаться” патогенами, в том числе и вирусами, то есть метабиом растений, включая вирусы и вредителей, может “умалчивать” этот процесс за счет имеющегося потенциала на разных этапах развития фитоиммунного процесса. Данное противодействие – пример сложной и интенсивной эволюционной борьбы между вирусами, фитопатогенами и фитофагами, с одной стороны, и растениями, с другой. Коэволюция между супрессорами и механизмом РНКи растений также свидетельствует о чрезвычайно сложной природе адаптации мутуалистов, симбиотрофов и патогенов к защитной системе растений.

Подробно о супрессорной активности ряда белков, закодированных в геноме вирусов, описано в обзорных работах [32, 48]. Этот феномен получил название “вирус-индуцированное подавление экспрессии генов” (virus-induced gene silencing, VIGS) [49], как противодействие ХИГС.

Данные, накопленные на современном этапе исследований, говорят о том, что вирусные супрессоры, названные вирусными супрессорами сайленсинга РНКи (viral silencing suppressors of RNA silencing, VSR), обладая широким спектром биохимических свойств, необходимы для подавления хозяйской РНКи как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях [3], а также на этапе передачи сигнала о развитии инфекционного процесса [50].

Белок HC-Pro (helper component-proteinase) – первый открытый VSR, кодируемый вирусами семейства *Potyviridae*, эффективно подавляющих защитные реакции и способствующие увеличению титра ВТМ и ВОМ, что доказано на трансгенных растениях табака, синтезирующих этот белок. В инфицированных вирусом растениях *S. tuberosum* белок HC-Pro формировал стабильный комплекс с ферментами метионинового цикла S-аденозил-L-метионин синтетазой 1 (S-adenosyl-L-methionine synthetase) и S-аденозил-L-гомоцистеин гидролазой (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase), рибосомальными белками и вирусными белком VPg-Pro, а также ключевым белком РНКи – AGO1 [51]. Белок HC-Pro проявил себя как негативный регулятор салицилат-зависимой защитной системы растений, непосредственно взаимодействуя с, например, белком SABP3 [52]. Мутация по гену HC-Pro у YBK возвращала устойчивость образцов картофеля *S. tuberosum*, имеющих ген *Ny* [53]. Точно так же белок С4 вируса курчавости листьев хлопчатника взаимодействовал с S-аденозил-L-метионин синтетазой 1 *N. benthamiana*, ингибируя его ферментативную активность. На мутантных растениях табака с подавленной ее активностью обнаружено замалчивание механизмов генного сайленсинга, что стимулировало развитие вирусов курчавости листьев хлопчатника и желтой курчавости листьев томата [54]. Известно, что белки 2b ВОМ, Р0 вируса скручивания листьев картофеля, Р38 оболочка вируса морщинистости листьев турнепса и Р1 вируса крапчатости листьев батата ингибировали работу комплекса RISC, нарушая работу белков семейства AGO [50]. Белок 2b ВОМ активно вовлекается в систему регуляции защитных систем растений, хотя и индуцирует накопление в инфицированных растениях и СК и ЖК, замалчивает развитие системной устойчивости как по салицилат-, так и жасмонат-индуцируемым путям [17]. Точно так же, с использованием трансгенных растений *A. thaliana* с гиперсинтезом белка 2b показано, что этот белок нарушает работу сигнальной антистрессовой программы, индуцируемой и АБК [55]. Можно предположить, что такое влияние белка 2b ВОМ соответствует установившемуся убеждению, что индуцируемые СК, ЖК и АБК сигнальные пути в растениях взаимно интерферируют друг друга. Кроме того, обнаружено, что

нарушение работы жасмонатной сигнальной системы белком 2b происходит посредством его взаимодействия с белками JAZ, что повышает привлекательность хозяина для насекомых и полезно для передачи вируса у арабидопсиса [56].

Вирус западной желтухи свеклы, кодирует белок Р0, взаимодействующий с гомологом S фазной киназы (SKP) – компонентом SCF семейства убиквитин Е3 лигазы. Показано, что F-box SKP взаимодействует с PAZ доменом в белке AGO1 и подготавливает его к деградации, а выключение экспрессии гена SKP формирует устойчивость к вирусам [57]. Гипернакопление белка Р0 в трансформированных растениях *A. thaliana* нарушало развитие растений и повышало уровень siRNA целевых транскриптов, указывая на то, что белок Р0 действует на уровне RISC комплекса. Способность Р0 вызывать деградацию AGO1 – наглядный пример вирусной адаптации к защитному механизму РНКи. Обнаружено, что белок Р0, экспрессирующийся в растениях *S. tuberosum*, инфицированных вирусом скручивания листьев картофеля, вызывает замалчивание механизма РНКи не только в растениях, но и в персиковой тле, переносчике данного вируса, что предполагает схожесть механизмов замалчивания этой защитной системы в растениях и их вредителях [58].

Белок Р6, кодируемый вирусом мозаики цветной капусты и требующий для трансляции 35S РНК, подавлял защитную реакцию растений *A. thaliana* при совместном инфицировании вирусом и патогенной бактерией *P. syringae* pv. *tomato*, проявляющуюся в замалчивании окислительного взрыва, снижении уровня СК и зависимой от салицилатов аутофагии [59]. Кроме того, обнаружено, что супрессорный эффект белка Р6 отражался на всей системе как салицилат-, так и жасмонат-индуцируемой защитных систем, затрагивая ключевой белок их сигнализации NPR1, что усиливало восприимчивость к биотрофам. При этом трансгенные растения, экспрессирующие белок Р6, характеризовались большей устойчивостью к жасмонат-чувствительным патогенам и восприимчивостью к салицилат-чувствительным [60].

Белок Р19 вируса кустистой карликовости томатов из семейства *Tombusviridae*, участвующий в процессах репродукции, движения, упаковки РНК и векторной трансмиссии вируса, подавлял защитные реакции в растениях табака *N. benthamiana*. Показано, что этот белок крайне необходим для системного проникновения и распространения вируса в растении перца (*Capsicum annuum*) и шпината (*Spinacia oleracea*). Формирование комплекса между димерами Р19 и дц siRNA как *in vivo*, так и *in vitro*, коррелировало с амплитудой симптомов вирусного заболевания в растениях [61]. Таким образом, функция белка Р19 состоит в том, что в ходе инфекции он связывает обильно циркулиру-

ющие вирусные siRNA, делая их недоступными для белкового комплекса RISC, и препятствует процессу защитного метилирования siRNA. Таким образом, есть основание предполагать, что способность P19 связывать siRNA может препятствовать работе фермента HEN1, ответственного за метилирование siRNA. Полная инактивация гена P19 приводит к полной деградации вирусной РНК и невозможности синтеза вирусных белков. Точно так же, предварительная обработка растений табака siRNA, эффективно взаимодействующих с белком P19, формировала защиту от вируса кустистой карликовости томатов [61].

Белок P21 (21 кДа) вируса желтухи свеклы подавляет РНК индуцированное умалчивание экспрессии белка GFP. В инфицированных вирусом растениях свеклы *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* белок P21 обнаруживается в клетке в качестве растворимого белка цитоплазмы, а также в форме нерастворимых белковых тел на периферии клетки. Другой гомолог белка P21 вируса цитрусовых тристеаза супрессирует РНКи на внутриклеточном и межклеточном уровнях [62], взаимодействуя со дцРНК и siRNA *in vivo*, препятствуя процессу их метилирования, но не воздействует на активность RISC комплекса. Кроме того, обнаружено, что в геноме вируса цитрусовых тристеаза обнаружены короткие не кодирующиеся РНК (low-molecular-weight tristeaza 1, LMT1), от наличия которых зависела его вирулентность в отношении растений табака *N. benthamiana*, проявляющаяся в резком снижении уровня СК в инфицированных растениях и активации альтернативной оксидазы, подавляющей окислительный взрыв [63].

Белок P38 (CP/p38) оболочки вируса морщинистости листьев турнепса отвечает за системное распространение и межклеточное движение вируса. Данный белок – сильный супрессор РНКи, что связывают с его взаимодействием с вирусной дцРНК вне зависимости от размера молекул. Это означает, что взаимодействие P38 с дцРНК препятствует доступности субстрата для DCL, например, DCL4. Это, соответственно, приводит к ослаблению аккумуляции 21 нт siRNA нуклеазой. Вместе с тем, белок P38 не препятствовал активности белка DCL2, синтезирующей 22 нт siRNA, но эффективно подавлял активность работы белкового комплекса RISC, взаимодействуя с AGO [64]. Такой механизм супрессии защитной системы интересен тем, что 22-нт siRNA, как было отмечено выше, проявляя сродство к белку AGO10, подавлял накопление AGO1 [41].

Цистеин-богатый 17кДа белок  $\psi$  вируса штриховой мозаики ячменя (ВШМЯ), хотя и не является обязательным для репликации и транспорта вируса, но существенно воздействует на процесс патогенеза, а взаимодействие вирусного белка с РНК – ключевая функция белка  $\psi$  в супрессии

РНКи. Первый косвенный признак возможного участия белка  $\psi$  в супрессии RNAi был получен в экспериментах с использованием мутанта вируса погремковости табака с нарушенным геном, кодирующим белок P16. Обнаружено, что белок  $\psi$  взаимодействовал с дцРНК посредством трех Zn-связывающих участков, находящихся на N (терминальной части белка), и стимулировался в присутствии Zn ионов [65].

Продукт гена *p122* ВТМ в растениях *S. tuberosum*, инфицированных дикими линиями вируса, репрессировал транскрипцию генов, кодирующих белки *Pidcl2* и *NtDCL2* и РНК-зависимой РНК-полимеразы *Pirdr1* и *NtRdR1*, соответственно, у инфицированных оомицетом *Ph. infestans* растений табака *N. tabaccum*. Нокаут-мутация гена *p122* в линии ВТМ *ст-Δ122* восстанавливала способность отмеченных генов растения и оомицета экспрессироваться [66].

Обнаружена высокая супрессорная активность, направленная против антивирусной РНКи, у вирусных генов, кодирующих РНКазы, принадлежащие к семейству III [67]. Важным белком семейства таких потивирусов, как шарки сливы, мозаики турнепса, ВМС и УВК, ответственным, с одной стороны, за репликацию вирусной РНК, а с другой, за подавление фитоиммунной системы хозяина, является кодируемая вирусным геномом РНК-зависимая РНК-полимераза N1b, формирующая репликационные комплексы с участием хозяйских белков и супрессирующая NPR1-опосредованный иммунный ответ [68].

**Фитогормоны.** В функционировании механизма РНКи в растениях важное место занимают фитогормоны. Поскольку СК является одним из ключевых сигнальных молекул, ответственных за индукцию СПУ растений к биотрофным патогенам, интерес представляет ее способность участвовать в работе системы РНКи. Координированная работа белков, вовлеченных в СПУ, с участвующими в РНКи белками пока не полностью расшифрована. Основные компоненты РНКи, такие как эндонуклеазы DCL2, DCL3 или DCL4, не были связаны с СПУ, индуцированной СК или ее функциональными аналогами [69], тогда как усиление транскрипционной активности гена *RdR1* происходило под влиянием СК и зависело от экспрессии белка NPR1 [4]. Соответственно, СК-индуцированная устойчивость к вирусам связана с РНКи через ген *RdR1* и координируется его продуктом. В свою очередь, экспрессия гена *RdR1* усиливала экспрессию генов, кодирующих RdR6 (система РНКи) и альтернативную оксидазу (про-/антиоксидантная система). Такая координация, по всей видимости, является гибкой, поскольку, например, в трансгенных растениях *A. thaliana*, накапливающих вирусный эффекторный белок 2b, экспрессия гена *AGO2* становилась

салицилат чувствительной [17]. Буквально недавно обнаружено, что СК и miR403a, комплементарная фрагменту гена *NbAGO2*, эффективно регулировали экспрессию гена *NbAGO2* в растениях табака *N. benthamiana* [26]. Белки AtAGO2 *A. thaliana* проявляли большую эффективность против PVX в сравнении с NbAGO2 из растений *N. benthamiana* [27]. Таким образом, полученные данные дополнительно объясняют, как защитные системы, ответственные за развитие СПУ и РНКи, могут совместно работать в растениях, как это ранее показано с использованием трансгенных растений NahG, экспрессирующих другой вирусный эффектор РНКи TEV P1/HC-Pro [70].

С использованием линии картофеля NahG-Désirée, дефицитной по СК, показано усиление восприимчивости растений к вирусам в сравнении с исходным сортом Désirée, связанное с падением уровня miR164, miR167, miR169, miR171, miR319, miR390 и miR393 [71]. Устойчивость растений и уровень miRNA восстанавливались после обработки аналогом СК – 2,6-дихлоризоникотиновой кислотой [72], то есть салицилатная сигнальная система вовлекалась в регуляцию РНКи через экспрессию пре-miRNA.

Соответственно, связь РНКи в растениях с салицилатной сигнальной системой не абсолютна. Поскольку в СК-индуцированной устойчивости растений табака к ВТМ и ВОМ белки DCL2, DCL3 и DCL4 не играли значительной роли [17], Lee с соавт. [4] выдвинули предположение, что противовирусная система защиты у растений табака с участием СК дополнительно затрагивает другие механизмы, например, сигнальные процессы, основанные на функционировании митохондриальных альтернативных дыхательных систем. Причем, такая связь была опосредована индукцией экспрессии гена *RDR1*, регулируемой СК [73]. Это говорит о том, что СК в растениях запускает несколько избыточных или параллельных защитных механизмов, как связанных, так и не связанных с белками DCL.

Важную роль в СК-регулируемой устойчивости играют miRNA, например, miR160. Так, линии картофеля с подавленной экспрессией miR160 не запускали в растениях системную приобретенную устойчивость (СПУ), регулируемую СК. Поскольку сигнальные системы, регулируемые СК и ауксинами, являются антагонистическими, можно полагать, что miR160 вовлечена в их перекрестное взаимодействие [37].

Участие АБК в системе защиты растений от вирусной, бактериальной и грибной инфекции обсуждалось ранее [74]. Этот фитогормон, являясь регулятором ответных реакций растений на, как правило, абиотический стресс, вовлекается и в фитоиммунные процессы, препятствуя колонизации патогенов в растительных тканях посред-

ством регуляции работы устьиц, экспрессии генов про-/антиоксидантной системы, а также синтеза каллозы. Наконец, выявлена важная роль АБК в регуляции работы механизма РНКи и, соответственно, в формировании фитоиммунитета к вирусам [55]. В растениях *A. thaliana*, гиперсинтезирующих АБК, индуцируется накопление транскриптов генов *AtAGO4* и *AtAGO10*. Точно так же, АБК индуцировала в линиях сои *Rsv3*, устойчивых к вирусу мозаики, накопление транскриптов гена *GmDCL2* [75]. Роль АБК в формировании устойчивости к вирусам с участием механизмов РНКи обобщена в обзорной работе Alazem и Lon [22]. Так, важность этого гормона в вирусоустойчивости, например, к вирусу мозаики бамбука, была связана с индукцией экспрессии генов *AtAGO1*, *AtAGO2* и *AtAGO3*, а также с репрессией накопления транскриптов *AtAGO4* и *AtAGO10*.

Несмотря на то, что в фитофизиологических реакциях СК и АБК часто обсуждаются с позиции антагонистов, они могут совместно модулировать различные защитные ответы, в том числе и РНКи, например, против вирусов, на уровне регуляции экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы (транс-факторы), а также основные белки механизма РНКи. Поскольку только в мутантных по уровню СК растениях АБК вызывала экспрессию генов *AGO1* и *RdR1*, можно предположить, что АБК запускает экспрессию генов каскада сигналов салицилат-зависимой экспрессии, а СК регулирует интенсивность накопления защитного продукта [22]. Выявлено, что растения с высоким уровнем синтеза AGO1 слабочувствительны к АБК и, наоборот, при нарушении синтеза AGO1 формируют гиперчувствительность к АБК. На растениях сои устойчивость к вирусу мозаики, опосредованная обработкой АБК, сопоставлялась отложением каллозы в зоне плазмодесма и накоплением транскриптов генов *AGO1*, *AGO4*, *AGO9*, *RdR2* и *RdR6* [22]. Показано, что в регуляции синтеза AGO1 с участием АБК важная роль принадлежит miR168, регулирующей противовирусный фитоиммунитет [41]. Полученные данные говорят о тесной связи механизмов РНКи с АБК-опосредованным сигнальным путем формирования устойчивости растений к вирусам.

Жасмонаты индуцируют в растениях устойчивость к некротрофам и вредителям. В отношении вирусных инфекций, а также биотрофных и гембиотрофных патогенов их роль противоречива. Анализ экспрессии генов AGO в растениях *O. sativa* в условиях инфицирования вирусом штриховатости (rice stripe virus, RSV) показал, что вирус многократно индуцирует гены *OsAGO1a*, *OsAGO1b*, *OsAGO3* и *OsAGO18*, транскрипты которых, вместе с тем, в жасмонат-нечувствительных соi1-13 растениях накапливались в меньшей степени, что коррелировало со степенью развития вируса [30]. В растениях табака в формировании устойчиво-

сти по жасмонатному сигнальному пути к грибу *F. brachygibbosum* оказалось критичным наличие белка NaAGO4 [9]. Индуцированное капсидным (коровым) белком (КБ) вируса накопление жасмоновой кислоты (ЖК), формирующее устойчивость растений *O. sativa* к вирусу, связано с активацией гена *OsAGO18* [30]. Снижение накопления ЖК, обусловленное индукцией miR319, в растениях *O. sativa*, инфицированных вирусом лохматой карликовости (rise ragged stunt virus, RRSV), формировало восприимчивость к вирусу [76]. Выявлено, что активация бактериями *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 устойчивости растений *A. thaliana* по жасмонатному сигнальному пути находится под контролем miR846. Это доказывается тем, что гиперэкспрессирующие и, напротив, нокдаун miR846 линии *A. thaliana*, а также растения, обработанные ингибитором синтеза ЖК – диэтилдитиокарбаминовой кислотой, оказались восприимчивы к *P. syringae* DC3000 [77].

Для более полной оценки важности механизма молекулярных отношений между защитной системой организма и вирусами необходимы дальнейшие детальные молекулярные, биохимические и структурные исследования вирусных супрессоров. Но уже известные данные говорят о сложной коэволюционной “гонке вооружений” между хозяевами-растениями и вирусами. Со временем эти знания могут быть реализованы для развития эффективных стратегий создания растений, устойчивых не только к вирусам, но и другим патогенам и вредителям.

**РНКи и защита растений.** Одним из передовых направлений исследований в данной области можно считать применение связанных с РНКи методов в совершенствовании методов генной инженерии и создании подходов в защите растений от различных патогенов и вредителей. Открытый Файром уникальный механизм РНКи предоставил биологам новый метод управления фенотипом растений и оценки биологической функции белков. Стратегии применения механизмов РНКи основываются на базовых знаниях формирования естественных шпилечных структур вирусными РНК (harpin RNA-mediated interference-based strategies), создания искусственных siRNA (на основе патогенной мРНК) и ta-siRNA (на основе мРНК генов-супрессоров иммунного ответа хозяина). На данный момент основным направлением стало создание генно-модифицированных (ГМ) и генно-редактированных (ГР) сортов и гибридов культур с повышенными показателями урожайности и качества, в том числе и с использованием современной технологии редактирования генов CRISPR/CasN с компонентами технологии РНКи [78]. Первым растением с искусственной системой защиты от вирусной инфекции, основанной на РНКи, получившим разрешение на использование в 1998 г., стал картофель со встроен-

ном геном *Orf1/Orf2* от вируса скручивания листьев [79]. Затем были проведены успешные испытания ГМ растений сливы *Prunus domestica* с геном, кодирующим КБ вируса скрытой мозаики. В США в растениеводство активно внедряются ГМ и ГР сорта тыквы *Cucurbita pepo* и папайи *Carica papaya*, устойчивые к вирусам скрытой мозаики и кольцевой пятнистости, соответственно, а в Китае – сорта сладкого перца *Capsicum annuum* и томатов *S. lycopersicum*. В обзорной работе Sang и Kim [80] приводится не менее 11 вариантов эффективных технологий защиты растений с использованием методов РНКи, например, ячменя *Hordeum vulgare* и пшеницы *Triticum aestivum* от гриба *Fusarium graminearum* с подавлением экспрессии генов *FgCYP 51* (гены биосинтеза эргостерола) и *FgChs3b* (ген хитин-синтазы), соответственно. Компании “Dow AgroSciences” и “Monsanto” (в настоящее время “Bayer CropScience”) включили в геном кукурузы *Z. mays* сорта SmartStax Pro (MON87411) вектор, экспрессирующий дцРНК гена *snf7* западного кукурузного жука *Diabrotica virgifera virgifera*, в число мер защиты трансгенов от формирования у вредителей устойчивости к токсину *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) [81].

Известно, что РТГС генов-мишеней может быть вызвано непосредственным введением дцРНК в клетки самого растения путем трансгеноза. Новые системы редактирования генома (gene editing system, GES) расширяют перечень инструментов, доступных для обеспечения устойчивости растений к вирусам с использованием компонентов РНКи. С использованием метода РНКи доказана важность рецепции патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), в частности хитина, в дальнейшем развитии оксидативного взрыва в зоне инфицирования. Например, сайленсинг гена *CEBiP*, ответственного за связывание хитоолигосахаридов в растениях *O. sativa*, с помощью технологии РНКи приводил к ингибированию образования активных форм кислорода и экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе [82]. Zhan с соавт. [78] показали, что линии картофеля *S. tuberosum*, экспрессирующие генно-инженерную кассету CRISPR/Cas13a, содержащую siRNA против РНК вируса картофеля Y, проявляли сниженное накопление вируса в тканях и, соответственно, менее выраженное проявление симптомов заболевания. Обнаружена прямая положительная корреляция устойчивости трансгенных линий с уровнем экспрессии siRNA.

Интересны результаты защиты растений кукурузы *Z. mays* от фузинозин-продуцирующих штаммов грибов *Fusarium verticillioides* с использованием антисенс-конструкций к соответствующим генам *FUM1* и *FUM8*, позволившим многократно снизить концентрацию токсина [83], что, по мнению авторов, позволяет создавать формы растений с соответствующими генами для контроля продукции

токсина возбудителем. Использование генно-модифицированных растений с антисенс-фрагментами жизненно важных генов насекомых позволило многократно снизить их вредоносность. Например, при помощи подобных фрагментов возможно влиять на транскрипционную активность генов, связанных со способностью насекомых деградировать никотин (бражник табачный *Manduca sexta*, *CYP6B46*) [84]), а также на экспрессию генов, кодирующих трипсиноподобную сериновую протеиназу (бурая рисовая цикадка *Nilaparvata lugens*, *Nltry*), трансмембранный белок – транспортер глюкозы (*N. lugens*, *NHT1*) [85]. Вместе с тем, трансгенные растения в целом, считая и содержащие гены РНКи, принимаются большинством населения весьма негативно и еще вызывают много вопросов и споров как в правовом, так и экологическом уровнях.

Особый интерес представляют работы, где предлагают использовать механизм РНКи с применением целевой дц РНК в качестве спреев, что открывает новые возможности в развитии научных технологий и стратегий защиты растений, с целью нарушения экспрессии жизненно важных генов вредителей и патогенов. Это направление защиты растений развивается очень быстро и описывается термином “индукция замолкания генов с помощью опрыскивания”, или спрей-индуцированного генного сайленсинга (СИГС, spray induced gene silencing, SIGS) [80, 86]. Уникальность данного метода сочетается также с тем, что, с одной стороны, сами дцРНК могут характеризоваться свойствами ПАМП и запускать защитную систему растительной клетки, связанную с классическими сигнальными системами защиты РТ1 и ЕТ1, опосредованными активацией рецепторных киназ SERK (somatic embryogenesis receptor-like kinase) и MAPK (mitogen-activated protein kinase), слабо взаимодействующих с механизмами РНКи. С другой стороны, дцРНК могут проникать в ткани растения, амплифицироваться, перерабатываться в siRNA, как правило 22 нт, и индуцировать природные механизмы РНКи и замолкания целевых генов вредителя, патогена или вируса после аппликаций препаратами дцРНК поверхности тканей растений [86].

Есть примеры использования препаратов, содержащих дцРНК, для контроля экспрессии генов патогенов. Так, нанесение препарата с целевой дцРНК на поверхность листьев *N. benthamiana* и *Vigna unguiculata* индуцировало в растениях механизмы РНКи и последующее разрушению РНК, например, вируса мозаики, причем не только при механической инокуляции вируса через поверхность листа, но и при передаче вируса насекомыми [87]. В работе Sammons с соавт. [90] продемонстрирована возможность влияния экзогенной дцРНК на супрессию генов устойчивости к гербициду, что может быть использовано для сниже-

ния формирования устойчивости сорняков к пестициду.

Тенлладо с соавт. [88] первыми продемонстрировали, что экзогенное применение молекул дцРНК в растениях в качестве спрея делает их устойчивыми к вирусным инфекциям. С тех пор технология использования дцРНК против вирусной инфекции усовершенствовалась. В целях повышения стабильности дцРНК и продления противовирусной защиты, Миттер с соавт. [89] связали дцРНК со слоистыми наночастицами глины размером 80–300 нм (BioClay). Такой комплекс оказался более защищен от нуклеаз и в меньшей степени смывался с поверхности листьев, и 330-нт дцРНК, нацеленная на КБ ВОМ, обнаруживалась в растениях в течение 30 дней после обработки [89]. Соответствующие результаты получены и при опрыскивании растений табака *N. benthamiana* и вигны *Vigna unguiculata* препаратом, содержащим наночастицы глины BioClay и 461-нт dsRNA, кодирующего КБ вируса мозаики бобов, нацеленного на сайленсинг КБ [87].

Перспективность борьбы с переносчиками вирусов на основе РНКи обсуждается также в аспекте создания различных биопестицидов в виде РНКи-спреев [90], в том числе биоинсектицидов (“RNAi-инсектицидов”), в основном для борьбы с насекомыми, в которой спрей-обработка вегетирующих растений дцРНК “замалчивает” гены вирулентности патогена или жизнедеятельности вредителя [91]. На современном этапе успешно проведены работы по использованию препаратов с использованием siRNA против личинок азиатского кукурузного мотылька (*Ostrinia furnacalis*), насекомых из отряда двукрылых (*Diptera*), например, комаров и мухи цеце, отряда полужесткокрылых (*Hemiptera*), таких как тли, белокрылка, галловыми, цистообразующими и другими паразитическими нематодами растений. Особо следует отметить, что в механизмах запуска РНКи в различных группах насекомых обнаружены физиологические различия, вынуждающие разработчиков дифференцированно подходить к созданию таких препаратов [92]. BASF опубликовал информацию об использовании препаратов на основе технологии РНКи (<https://www.researchandmarkets.com/reports/5007781/agricultural-biotechnology-emerging-technologies>). К настоящему времени концерн уже запатентовал некоторые изобретения в области средств борьбы с нематодами, использующие механизм РНКи. Предполагается, что максимальная продолжительность “жизни” таких РНК-молекул в составе препаратов будет составлять примерно 20 – 30 дней. Такая схема принципиально отличается от защиты растений с помощью генетической модификации, но требует разработки методов доставки “РНКи-инсектицида”, “РНКи-фунгицида” или

“РНК-вирицида” в растение, защиты РНК-молекул от солнечного света, смыва дождем.

Установлено, что поступление дцРНК с пищей в организм насекомых может ингибировать экспрессию генов-мишеней и, тем самым, вызывать целевые фенотипические эффекты, например, гибель личинок, взрослых особей, снижение плодовитости и т.д. [92]. Например, у целого ряда опасных насекомых-вредителей (*Mythimna separata*, *Halyomorpha halys*, *Nilaparvata lugens*, *Lymantria dispar*, *Helicoverpa armigera*, *Bemisia tabaci*, *Spodoptera exigua*, *Chilo suppressalis* и др.) пероральное поступление дцРНК с пищей подавляет активность целевых генов-мишеней. На примере колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* показано, что ингибирование работы дцРНК-специфичных РНКаз усиливает эффект РНК-инсектицидов при пероральном введении [93]. В КНР созданы линии кукурузы *Z. mays* и сои *Glycine max*, экспрессирующие фрагменты гена АТФ-азы клопа слепняка *Apolygus lucorum*, многократно снизившие повреждаемость культур этим вредителем [94]. При создании препаратов на основе РНКи необходимо помнить и о том, что механизм регуляции замалчивания защитных генов в растениях, заселенных вредителями, может быть связан и с симбионтными микробиомами, которые, обладая собственной системой супрессии фитозащитных систем, могут способствовать более активному ими освоению пищевой ниши.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные молекулярные и биохимические исследования супрессоров фитоиммунных реакций различного происхождения значительно расширили представления о всей сложности процесса РНКи, а также заметно углубили наше понимание природы взаимоотношений между растениями и патогенами. Кроме того, на сегодняшний день идентифицированы уже тысячи коротких регуляторных РНК, а сам механизм РНКи на отдельных растительных объектах, например, на арабидопсисе, подробно изучен. Однако, бесспорно то, что очень многое в этой области еще предстоит исследовать. Например, мало известно о роли РНКи в регуляции защиты низших наземных форм растений и водорослей от патогенов, а также ее роли во взаимоотношениях между растениями и паразитарными формами растений. Остаются нераскрытыми физиологические механизмы взаимодействия РНКи с классическими сигнальными фитоиммунными системами, ответственными за системную устойчивость и регулируемыми СК и ЖК. Но, можно полагать, что механизмы РНКи в растительных клетках независимы от индуцируемых ПАМП сигнальных систем защиты и относительно нечувствительны к таким низкомолекулярным сигнальным молекулам как ЖК и СК, актив-

ные формы кислорода, ионы кальция и другие вторичные мессенджеры. Потенциалом для исследований может быть также оценка работы механизмов РНКи в условиях формирования многоуровневого растительного микробиома, состоящего, как минимум, из патогена и эндофита и/или симбионта как, например, в системе “хозяин – патоген – эндофитная бактерия”.

С одной стороны, поскольку механизм РНКи является естественным и эффективно работает во всех таксонах живых организмов, предполагается, что фитопатогены (вирусы, бактерии, грибы и оомицеты) и насекомые-вредители такую защитную систему легко обойти не смогут. С другой стороны, поскольку при использовании экзогенных дцРНК целевые эффекты достигаются без изменения структуры генома растений, на них не должны распространяться запреты, связанные с использованием ГМО. Действительно, новозеландское агентство защиты окружающей среды в 2018 г. признало, что организмы, обработанные дцРНК, не относятся к ГМО [95], и, соответственно, разрешило использование препаратов, содержащих дцРНК для индукции РНКи и контроля экспрессии генов (<https://www.epa.govt.nz/assets/FileAPI/hsno-ar/APP203395/APP203395-Decision-FINAL-.pdf>). Министерство промышленности Новой Зеландии включило РНК в список безопасных для окружающей среды веществ (<https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/5134>). Правда, это не снимает вопросов перспективности и безопасности использования такого экономически выгодного подхода для укрепления устойчивости растений к вирусам, патогенам и вредителям, поскольку потенциал и безопасность метода аппликаций экзогенной дцРНК слабо исследованы и не все риски еще определены. Вместе с тем, можно полагать, что трансгены на основе РНКи являются выгодными и экологически более чистыми, поскольку такие растения не продуцируют никаких функциональных чужеродных белков и биоцидных веществ, а также не загрязняют окружающую среду.

Данные по функционированию механизмов РНКи позволят разработать весьма эффективные стратегии борьбы с комплексом патогенов и вредителей в агроценозе, способствующие повышению урожайности сельскохозяйственных культур, избегая при этом применения экологически опасных пестицидов. Возможность молекулярного переключения (активации) генов устойчивости к заболеваниям, индуцированное хозяином глушение генов патогена и даже вредителя также предоставляет возможность для разработки нового поколения пестицидов на основе дцРНК. Особо следует отметить то, что технологии регуляции численности вредителей, патогенов и вирусов в агроценозе могут быть осуществлены как путем классического внедрения векторов с кассетами РНКи в геном растений и регулирования работы

природных механизмов ХИГС, так и использованием дцРНК в виде спреев непосредственно для обработки растений или привлечения эндофитов, как генераторов РНКи.

Таким образом, экзогенное применение молекул дцРНК с потенциалом запуска РНКи является мощным инструментом в современных платформах защиты растений и улучшения урожая, учитывая политическое и общественное давление для устойчивого решения текущих сельскохозяйственных проблем. Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что присутствие молекул системы РНКи в рационе человека не представляет для него угрозы [96]. Вместе с тем, при явном положительном защитном эффекте целевых дцРНК в экспериментальных условиях, остаются вопросы по подбору гиперпродуцентов дцРНК, массовому накоплению целевого продукта, обеспечению его сохранности и использования в полевых условиях для защиты растений от патогенов и вредителей.

Работа выполнена в рамках совместного международного гранта Российского научного фонда Российской Федерации № 19-46-02004 и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии № C/1756/IFD/2019-20.

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. Fire A.Z. WITHDRAWN: Gene silencing by double-stranded RNA // *Cell Death Differ.* 2007. V. 14. P. 1998. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402253>
2. Muhammad T., Zhang F., Zhang Y., Liang Y. RNA Interference: A natural immune system of plants to counteract biotic stressors // *Cells.* 2019. V. 8: 38. <https://doi.org/10.3390/cells8010038>
3. Rakhshandehroo F., Rezaee S., Palukaitis P. Silencing the tobacco gene for RNA-dependent RNA polymerase 1 and infection by potato virus Y cause remodeling of cellular organelles // *Virology.* 2017. V. 510. P. 127. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.013>
4. Lee W.S., Fu S.F., Li Z., Murphy A.M., Dobson E.A., Garland L., Chaluvadi S.R., Lewsey M.G., Nelson R.S., Carr J.P. Salicylic acid treatment and expression of an RNA-dependent RNA polymerase 1 transgene inhibit lethal symptoms and meristem invasion during tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana* // *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16: 15. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0705-8>
5. Hunter L.J.R., Brockington S.F., Murphy A.M., Pate A.E., Gruden K., Macfarlane S.A., Palukaitis P., Carr J.P. RNA-dependent RNA polymerase 1 in potato (*Solanum tuberosum*) and its relationship to other plant RNA-dependent RNA polymerases // *Sci. Rep.* 2016. V. 6: 23082. <https://doi.org/10.1038/srep23082>
6. Qin L., Mo N., Zhang Y., Muhammad T., Zhao G., Zhang Y., Liang Y. CaRDR1, an RNA-dependent RNA polymerase plays a positive role in pepper resistance against TMV // *Front Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01068>
7. Campos L., Granell P., Tárraga S., López-Gresa P., Conejero V., Bellés J.M., Rodrigo I., Lisón P. Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 77. P. 35. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.016>
8. Prakash V., Chakraborty S. Identification of transcription factor binding sites on promoter of RNA-dependent RNA polymerases (RDRs) and interacting partners of RDR proteins through in silico analysis // *Physiol Mol Biol Plants.* 2019 V. 25(4). P. 1055. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00660-w>
9. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. Argonaute 4 modulates resistance to *Fusarium brachygybbsum* infection by regulating jasmonic acid signaling // *Plant Physiol.* 2020. V. 184. P. 1128. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00171>
10. Hong W., Qian D., Sun R., Jiang L., Wang Y., Wei C., Zhang Z., Li Y. OsRDR6 plays role in host defense against double-stranded RNA virus, Rice Dwarf Phytoreovirus // *Sci. Rep.* 2015. V. 5: 11324. <https://doi.org/10.1038/srep11324>
11. Song X., Ying X. Salicylic acid deficient *Nicotiana benthamiana* attenuated virus induced gene silencing but did not affect transgene-induced posttranscriptional gene silencing nor general biogenesis of microRNAs // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2019. V. 106. P. 276. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2019.03.005>
12. Fei Q., Yu Y., Liu L., Zhang Y., Baldrich P., Dai Q., Chen X., Meyers B.C. Biogenesis of a 22-nt microRNA in *Phaseoleae* species by precursor-programmed uridylation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. P. 8037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807403115>
13. Wagh S.G., Alam M.M., Kobayashi K., Yaeno T., Yamamoto N., Toriba T., Hirano H.Y., Nishiguchi M. Analysis of rice RNA-dependent RNA polymerase 6 (*OsRDR6*) gene in response to viral, bacterial and fungal pathogens // *J. Gen. Plant Pathol.* 2016. V. 82. P. 12. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0630-y>
14. Mukherjee K., Campos H., Kolaczowski B. Evolution of animal and plant Dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 627. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss263>
15. Liu Q., Feng Y., Zhu Z. Dicer-like (DCL) proteins in plants // *Funct. Integr. Genomics.* 2009. V. 9. P. 277. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0111-5>
16. Garcia-Ruiz H., Carbonell A., Hoyer J.S., Fahlgren N., Gilbert K.B., Takeda A., Giampetruzzi A., Garcia-Ruiz M.T., McGinn M.G., Lowery N., Martinez Baladejo M.T., Carrington J.C. Roles and programming of Arabidopsis Argonaute proteins during turnip mosaic virus infection // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11: e1004755. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004755>

17. Lewsey M.G., Murphy A.M., Maclean D., Dalchau N., Westwood J.H., Macaulay K., Bennett M.H., Moulin M., Hanke D.E., Powell G., Smith A.G., Carr J.P. Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2010. V. 23(7). P. 835.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0835>
18. Zhang X., Zhao H., Gao S., Wang W.C., Katiyar-Agarwal S., Huang H.D., Raikhel N., Jin H. Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393\*-mediated silencing of a golgi-localized SNARE gene, MEMB12 // *Mol. Cell.* 2011. V. 42. P. 356.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.010>
19. Jia H., Kolaczowski O., Rolland J., Kolaczowski B. Increased affinity for RNA targets evolved early in animal and plant Dicer lineages through different structural mechanisms // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. P. 3047.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx187>
20. Luan F., Han Y., Zhu H., Shao Y., Chen A., Tian H., Luo Y., Zhu B. Computational predicting novel MicroRNAs in tomato and validating with RT-PCR. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2010. V.57. P. 469.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443710040035>
21. Carbonell A., Carrington J.C. Antiviral roles of plant Argonautes // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V.27. P. 111.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.013>
22. Alazem M., Lon N.-Sh. Interplay between ABA signaling and RNA silencing in plant viral resistance // *Curr. Opin. Virol.* 2020. V. 42. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.002>
23. Qu F., Ye X., Morris T.J. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 14732.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805760105>
24. Paudel D.B., Ghoshal B., Jossey S., Ludman M., Fatyol K., Sanjaçon H. Expression and antiviral function of ARGONAUTE 2 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with two isolates of tomato ringspot virus with varying degrees of virulence // *Virology.* 2018. V. 524. P. 127.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.08.016>
25. Odokonyero D., Mendoza M.R., Alvarado V.Y., Zhang J., Wang X., Scholthof H.B. Transgenic down-regulation of ARGONAUTE2 expression in *Nicotiana benthamiana* interferes with several layers of antiviral defenses // *Virology.* 2015. V. 486. P. 209.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.008>
26. Diao P., Zhang Q., Sun H., Ma W., Cao A., Yu R., Wang J., Niu Y., Wuriyanghai H. miR403a and SA are involved in NbAGO2 mediated antiviral defenses against TMV infection in *Nicotiana benthamiana* // *Genes.* 2019. V. 10(7): 526.  
<https://doi.org/10.3390/genes10070526>
27. Brosseau C., Bolaji A., Roussin-Léveillé C., Zhao Z., Biga S., Moffett P. Natural variation in the *Arabidopsis* AGO2 gene is associated with susceptibility to potato virus X // *New Phytol.* 2020. V. 226. P. 866.  
<https://doi.org/10.1111/nph.16397>
28. Ma X., Nicole M.C., Meteignier L.V., Hong N., Wang G., Moffett P. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 919.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru447>
29. Harvey J.J.W., Lewsey M.G., Patel K., Westwood J., Heimstädt S., Carr J.P., Baulcombe D.C. An antiviral defense role of AGO2 in plants // *PLoS One.* 2011. V. 6: e14639.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014639>
30. Yang Z., Huang Y., Yang J., Yao S., Zhao K., Wang D., Qin Q., Bian Z., Li Y., Lan Y., Zhou T., Wang H., Liu Ch., Wang W., Qi Y., Xu Z., Li Y. Jasmonate signaling enhances RNA silencing and antiviral defense in rice // *Cell Host Microbe.* 2020. V 28. P. 89.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.001>
31. Agorio A., Vera P. Argonaute 4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 3778.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.054494>
32. Leonetti P., Miesen P., van Rijb R.P., Pantaleoa V. Viral and subviral derived small RNAs as pathogenic determinants in plants and insects // *Adv. Virus Res.* 2020. V. 107. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.04.001>
33. Guo Z., Li Y., Ding S.W. Small RNA-based antimicrobial immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2019. V.19. P. 31.  
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0071-x>
34. Lewsey M.G., Hardcastle T.J., Melnyk C.W., Molnar A., Valli A., Urich M.A., Nery J.R., Baulcombe D.C., Ecker J.R. Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113: E801.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1515072113>
35. Huang Ch.-Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H. Small RNAs – big players in plant-microbe interactions // *Cell Host Microbe.* 2019. V. 26. P. 173.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.021>
36. Qi T., Guo J., Peng H., Liu P., Kang Z., Guo J. Host-induced gene silencing: A powerful strategy to control diseases of wheat and barley // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20: 206.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20010206>
37. Natarajan B., Kalsi H.S., Godbole P., Malankar N., Thiagarayaselvam A., Siddappa S., Thulasiram H.V., Chakrabarti S.K., Banerjee A.K. miRNA160 is associated with local defense and systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* infection in potato // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 2023.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery025>
38. Zhang T., Zhao Y.L., Zhao J.H., Wang S., Jin Y., Chen Z.Q., Fang Y.Y., Hua C.L., Ding S.W., Guo H.S. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen // *Nat. Plants.* 2016. V. 2. P. 1.  
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.153>
39. Luan Y., Cui J., Li J., Jiang N., Liu P., Meng J. Effective enhancement of resistance to *Phytophthora infestans* by overexpression of miR172a and b in *Solanum lycopersicum* // *Planta.* 2018. V. 247. P. 127.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2773-x>
40. Cai Q., He B., Kogel K.H., Jin H. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi-nature's blueprint for modern crop protection strategies // *Curr. Opin.*

- Microbiol. 2018. V. 46. P. 58.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.003>
41. Iki T., Clery A., Bologna N.G., Sarazin A., Brosnan C.A., Pumplun N., Allain F.H.T., Voinnet O. Structural flexibility enables alternative maturation, ARGONAUTE sorting and activities of miR168, a global gene silencing regulator in plants // *Mol. Plant*. 2018. V.11. P. 1008.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.05.006>
  42. Yu X., Hou Y., Chen W., Wang S., Wang P., Qu S. *Malus hupehensis* miR168 targets to ARGONAUTE1 and contributes to the resistance against *Botryosphaeria dothidea* infection by altering defense responses // *Plant Cell Physiol*. 2017. V. 58(9). P. 1541.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx080>
  43. Zhang X., Bao Y., Shan D., Wang Z., Song X., Wang Z., Wang J., He L., Wu L., Zhang Z., Niu D., Jin H., Zhao H. *Magnaporthe oryzae* induces the expression of a microRNA to suppress the immune response in rice // *Plant Physiol*. 2018. V. 177. P. 352.  
<https://doi.org/10.1104/pp.17.01665>
  44. Han G.Z. Origin and evolution of the plant immune system // *New Phytol*. 2019. V. 222. P. 70.  
<https://doi.org/10.1111/nph.15596>
  45. Niu D., Xia J., Jiang C., Qi B., Ling X., Lin S., Zhang W., Guo J., Jin H., Zhao H. *Bacillus cereus* AR156 primes induced systemic resistance by suppressing and activating defense-related genes in *Arabidopsis* // *J. Integr. Plant Biol*. 2016. V. 58. P. 426.  
<https://doi.org/10.1111/jipb.12446>
  46. Boccara M., Sarazin A., Thiébeault O., Jay F., Voinnet O., Navarro L., Colot V. The *Arabidopsis* miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP- and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes // *PLoS Pathog*. 2014. V. 10: e1003883.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003883>
  47. Lee C.H., Carroll B.J. Evolution and diversification of small RNA pathways in flowering plants // *Plant Cell Physiol*. 2018. V. 59. P. 2169.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy167>
  48. Omarov R.T., Bersimbai R.I. Biochemical mechanisms of suppression of RNA interference by plant viruses // *Biochemistry*. 2010. V. 75. P. 965.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297910080031>
  49. Lange M., Yellina A.L., Orashakova S., Becker A. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: An overview of target species and the virus-derived vector systems // *Virus-induced gene silencing: Methods and protocols, methods in molecular biology* / Ed. Becker A. New York: Springer Science, 2013. P. 1.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-278-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-278-0_1)
  50. Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M., Miura C., Neriya Y., Namba S. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M // *J. Virol*. 2011. V. 85. P. 10269.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.05273-11>
  51. Ivanov K.I., Eskelin K., Bašić M., De S., Löhms A., Varjosalo M., Mäkinen K. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro // *Plant J*. 2016. V. 85. P. 30.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.13088>
  52. Poque S., Wu H.W., Huang C.H., Cheng H.W., Hu W.C., Yang J.Y., Wang D., Yeh S.D. Potyviral gene-silencing suppressor HCPro interacts with salicylic acid (SA)-binding protein 3 to weaken SA-mediated defense responses // *Mol. Plant Microbe Interact*. 2018. V. 31. P. 86.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0128-FI>
  53. Tian Y.P., Valkonen J.P. Genetic determinants of Potato virus Y required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group O controlled by the gene Ny in potato // *Mol. Plant Microbe Interact*. 2013. V. 26. P. 297.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0219-R>
  54. Ismayil A., Haxim Y., Wang Y., Li H., Qian L., Han T., Chen T., Jia Q., Yihao Liu A., Zhu S., Deng H., Gorovits R., Hong Y., Hanley-Bowdoin L., Liu Y. Cotton Leaf Curl Multan virus C4 protein suppresses both transcriptional and post-transcriptional gene silencing by interacting with SAM synthetase // *PLoS Pathog*. 2018. V. 14: e1007282.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007282>
  55. Westwood J.H., McCann L., Naish M., Dixon H., Murphy A.M., Stancombe M.A., Bennett M.H., Powell G., Webb A.A., Carr J.P. A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant Pathol*. 2013. V. 14. P. 158.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00840.x>
  56. Wu D., Qi T., Li W.X., Tian H., Gao H., Wang J., Ge J., Yao R., Ren C., Wang X.B., Liu Y., Kang L., Ding Sh.-W., Xie D. Viral effector protein manipulates host hormone signaling to attract insect vectors // *Cell Res*. 2017. V. 27. P. 402.  
<https://doi.org/10.1038/cr.2017.2>
  57. Burgyan J., Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing // *Trends Plant Sci*. 2011. V. 16. P. 265.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.010>
  58. Pinheiro P.V., Wilson J.R., Xu Y., Zheng Y., Rebelo A.R., Hosseini S.F., Kruse A., Dos Silva R.S., Xu Y., Kramer M., Giovannoni J., Fei Z., Gray S., Heck M. Plant viruses transmitted in two different modes produce differing effects on small RNA-mediated processes in their aphid vector // *Phytobiomes J*. 2019. V.3 P.71.  
<https://doi.org/10.1094/PBIOMES-10-18-0045-R>
  59. Zvereva A.S., Golyaev V., Turco S., Gubaeva E.G., Rajeswaran R., Schepetilnikov M.V., Srouf O., Ryabova L.A., Boller T., Pooggin M.M. Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants // *New Phytol*. 2016. V. 211. P. 1020.  
<https://doi.org/10.1111/nph.13967>
  60. Love A.J., Geri C., Laird J., Carr C., Yun B.W., Loake G.J., Tada Y., Sadanandom A., Milner J.J. Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity // *PLoS One*. 2012. V. 7: e47535.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047535>
  61. Sutula M.Y., Akbassova A.Z., Yergaliyev T.M., Nurbekova Z.A., Mukiyanova G.S., Omarov R.T. Endowing plants with tolerance to virus infection by their preliminary treatment with short interfering RNAs // *Russ. J. Plant Physiol*. 2017. V. 64. P. 939.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443717060103>

62. *Scholthof H.B.* Heterologous expression of viral RNA interference suppressors: RISC management // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. P. 1110. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106807>
63. *Kang S.H., Sun Y.D., Atallah O.O., Huguet-Tapia J.C., Noble J.D., Folimonova S.YA* Long non-coding RNA of *Citrus tristeza virus*: Role in the virus interplay with the host immunity // *Viruses.* 2019 V. 11: 436. <https://doi.org/10.3390/v11050436>
64. *Chattopadhyay M., Stupina V.A., Gao F., Szarko C.R., Kuhlmann M.M., Yuan X., Shi K., Simon A.E.* Requirement for host RNA-silencing components and the virus-silencing suppressor when second-site mutations compensate for structural defects in the 3' untranslated region // *J. Virol.* 2015. V. 89. P. 11603. <https://doi.org/10.1128/JVI.01566-15>
65. *Yamamura Y., Scholthof H.B.* Tomato bushy stunt virus: a resilient model system for studying virus-plant interactions // *Mol. Plant Pathol.* 2005. V. 6. P. 491. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00301.x>
66. *Mascia T., Labarile R., Doohan F., Gallitelli D.* Tobacco mosaic virus infection triggers an RNAi-based response in *Phytophthora infestans* // *Scientific Reports.* 2019. V. 9: 2657. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39162-w>
67. *Kreuze J.F., Savenkov E.I., Cuellar W., Li X., Valkonen J.P.* Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing // *J. Virol.* 2005. V. 11. P. 7227. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7227-7238.2005>
68. *Shen W., Shi Y., Dai Z., Wang A.* The RNA-dependent RNA polymerase N1b of potyviruses plays multifunctional, contrasting roles during viral infection // *Viruses.* 2020. V. 12: 77. <https://doi.org/10.3390/v12010077>
69. *Matsuo Y., Novianti F., Takehara M., Fukuhara T., Arie T., Komatsu K.* Acibenzolar-S-methyl restricts infection of *Nicotiana benthamiana* by plantago asiatica mosaic virus at two distinct stages // *Mol. Plant Microbe Interac.* 2019. V. 32. P. 1475. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-19-0087-R>
70. *Alamillo J.M., Saénz P., García J.A.* Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco // *Plant J.* 2006. V. 48. P. 217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02861.x>
71. *Xia R., Xu J., Meyers B.C.* The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants // *Plant Cell.* 2017. V. 29. P. 1232. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00185>
72. *Baebler S., Stare K., Kovac M., Blejcek A., Prezelj N., Stare T., Kogovsek P., Pompe-Novak M., Rosahl S., Ravnikar M., Gruden K.* Dynamics of responses in compatible potato-potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid // *PLoS One.* 2011. V. 6: e29009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029009>
73. *Murphy A.M., Zhou T., Carr J.P.* An update on salicylic acid biosynthesis, its induction and potential exploitation by plant viruses // *Curr. Opin. Virol.* 2020. V. 42. P. 8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.008>
74. *Maksimov I.V.* Abscisic acid in the plants-pathogen interaction // *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 742. <https://doi.org/10.1134/S102144370906003X>
75. *Alazem M., Kim K.H., Lin N.S.* Effects of abscisic acid and salicylic acid on gene expression in the antiviral RNA silencing pathway in Arabidopsis // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20: E2538. <https://doi.org/10.3390/ijms20102538>
76. *Zhang C., Ding Z., Wu K., Yang L., Li Y., Yang Z., Shi S., Liu X., Zhao S., Yang Z., Wang Y., Zheng L., Wei J., Du Z., Zhang A., Miao H., Li Y., Wu Z., Wu J.* Suppression of jasmonic acid-mediated defense by viral-inducible microRNA319 facilitates virus infection in rice // *Mol. Plant* 2016. V. 9. P. 1302. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.014>
77. *Xie S., Jiang H., Ding T., Xu Q., Chai W., Cheng B.* *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 represses plant miR846 to induce systemic resistance via a jasmonic acid-dependent signalling pathway // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. P. 1612. <https://doi.org/10.1111/mpp.12634>
78. *Singh K., Dardick Ch., Kindu J.K.* RNAi-mediated resistance against viruses in perennial fruit plants // *Plants.* 2019. V. 8: 359. <https://doi.org/103390/plants8100359>
79. *Ares X., Calamante G., Cabral S., Lodge J., Hemenway P., Beachy R.N., Mentaberry A.* Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses // *J. Virol.* 1998 V. 72. P. 731. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.731-738.1998>
80. *Sang H., Kim J.* Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS) // *Plant Biotechnol. Rep.* 2020. V. 14. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00588-3>
81. *Bachman P.M., Bolognesi R., Moar W.J., Mueller G.M., Paradise M.S., Ramaseshadri P., Tan J., Uffman J.P., Warren J., Wiggins B.E., Levine S.L.* Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. P. 1207. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9716-9715>
82. *Kouzaï Y., Nakajima K., Hayafune M., Ozawa K., Kaku H., Shibuya N., Minami E., Nishizawa Y.* CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers // *Plant Mol. Biol.* 2014. V. 84. P. 519. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0149-6>
83. *Johnson E.T., Proctor R.H., Dunlap C.A., Busman M.* Reducing production of fumonisin mycotoxins in *Fusarium verticillioides* by RNA interference // *Mycotoxin Res.* 2018. V. 34: 29. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0296-8>
84. *Kumar P., Pandit S.S., Steppuhn A., Baldwin I.T.* Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated anti-predator herbivore defense // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 1245. <https://doi.org/10.1073/pnas>
85. *Zha W., Peng X., Chen R., Du B., Zhu L., He G.* Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-me-

- diated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens* // PLoS One. 2011. V. 6: e20504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020504>
86. Dalakouras A., Wassenegger M., Dadami E., Ganopoulos I., Pappas M.L., Papadopoulou K. Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants // Plant Physiol. 2020. V. 182. P. 38. [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.19.00570](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.19.00570)
  87. Worrall E.A., Bravo-Cazar A., Nilon A.T., Fletcher S.J., Robinson K.E., Carr J.P., Mitter N. Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: 265. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00265>
  88. Tenllado F., Díaz-Ruiz J.R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection // J. Virol. 2001. V. 75. P. 12288. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12288-12297.2001>
  89. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q., Xu Z.P. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses // Nat. Plants. 2017. V. 3: 16207. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
  90. Fletcher S.J., Reeves P.T., Hoang B.T., Mitter N. A perspective on RNAi-based biopesticides // Front. Plant Sci. 2020. V. 11: 51. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>
  91. Wang M., Jin H. Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection // Trends Microbiol. 2017. V. 25. P. 4. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>
  92. Christiaens O., Whyard S., Velez A.M., Smagghe G. Double-stranded RNA technology to control insect pests: current status and challenges // Front. Plant Sci. 2020. V. 11: 451. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00451>
  93. Spit J., Philips A., Wynant N., Santos D., Plaetinck G., Van den Broeck J. Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2017. V. 81. P. 103. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.01.004>
  94. Liu F., Yang B., Zhang A., Ding D., Wang G. Plant-mediated RNAi for controlling *Apolygus lucorum* // Front Plant Sci. 2019. V. 10. P. 64. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00064>
  95. Heinemann J.A. Should dsRNA treatment supplied in outdoor environments be regulated? // Environ. Int. 2019. V. 4. P. 104856. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.050>
  96. Sherman J., Munyikwa T., Chan S., Petrick J., Witwer K., Choudhuri S. RNAi technologies in agricultural biotechnology // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2015. V. 73. P. 671. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.001>

## JETGENE – ИНТЕРНЕТ-РЕСУРС ДЛЯ АНАЛИЗА РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ИЛИ НУКЛЕОТИДНЫХ КОНТЕКСТОВ У ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ТРАНСЛИРУЕМЫХ ТРАНСКРИПТОВ РАСТЕНИЙ<sup>1</sup>

© 2021 г. Н. С. Садовская<sup>a, \*</sup>, О. Н. Мустафаев<sup>b, c</sup>, А. А. Тюрин<sup>a</sup>,  
И. В. Дейнеко<sup>a</sup>, И. В. Голденкова-Павлова<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>b</sup>Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан

<sup>c</sup>Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

\*e-mail: nataliya.sadovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 02.12.2020 г.

После доработки 20.12.2020 г.

Принята к публикации 20.12.2020 г.

Различные регуляторные коды, содержащиеся в мРНК, могут определять судьбу любого транскрипта в процессе трансляции. Для поиска подобных регуляторных кодов и изучения их влияния на эффективность трансляции, мы разработали интернет-ресурс JetGene (<https://jetgene.bioset.org/>). Он содержит CDS, cDNA, 5'-UTR, 3'-UTR последовательности из шести основных групп живых организмов, включая растения. Данный интернет-ресурс имеет дружелюбный интерфейс, соединяет воедино широкий набор опций, предназначенный для сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей и позволяет (1) оценить вариации длины, нуклеотидного состава, частоты использования кодонов, проанализировать GC-состав, CpG-острова, окружение стартового кодона и др.; (2) выявить и определить статистически значимую представленность потенциальных регуляторных контекстов в мРНК с разной эффективностью трансляции. Пользователь может сделать разносторонний *in silico* анализ полноразмерных или усеченных транскриптов, а также их кодирующих/некодирующих областей. Каждый этап анализа сопровождается графической интерпретацией результатов.

**Ключевые слова:** *in silico* анализ, регуляторные коды, мотивы, эффективность трансляции

**DOI:** 10.31857/S001533032104014X

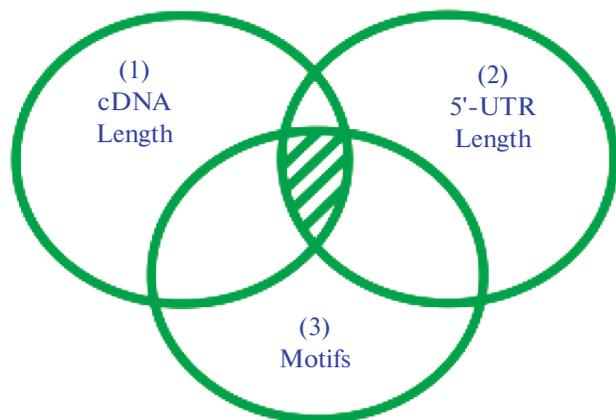
### ВВЕДЕНИЕ

Трансляция представляет собой фундаментальный процесс и важную начальную точку в регуляции экспрессии генов для клеток всех живых организмов, поскольку в этом процессе раскрывается кодирующий потенциал мРНК через молекулу белка. В настоящее время преобладающее мнение о трансляционном контроле состоит в том, что он играет ключевую роль в совокупности клеточных процессов растений, например, в их ответе на всевозможные факторы окружающей среды и различные метаболиты [1]. Особого внимания заслуживает выявленная несоразмерность уровней мРНК с их белковыми продуктами, которая характерна для клеток эукариот в целом и для клеток растений в частности [2]. Континуум

различных и, в тоже время, изящных экспериментальных исследований указывает на то, что в процессе декодирования генома, наряду с каноническими трансляционными правилами, довольно часто могут применяться правила регуляции и декодирования более высокого уровня. Это свидетельствует о наличии специфических регуляторных кодов, участвующих в трансляции мРНК растений.

Следует напомнить, что мРНК включают в себя 5'-нетранслируемую область (5'-UTR), кодирующий регион (CDS) и 3'-нетранслируемую область (3'-UTR), которые модулируют трансляцию в ряде “контрольных точек”: инициации, элонгации и терминации трансляции. Согласно текущему мнению, многочисленные регуляторные коды могут быть скрыты в нуклеотидных контекстах этих областей мРНК. Каждый из этих кодов в отдельности или несколько из них в сочетании друг с другом могут определять дальнейшую судьбу любого транскрипта в процессе трансляции [2].

<sup>1</sup> К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизованных пользователей по doi: 10.31857/S001533032104014X



**Рис. 1.** Алгоритм “Система вложенных выборов”. Окружности схематически изображают возможность выбрать последовательности по критериям “cDNA Length”, “5'-UTR Length”, “Motifs”. В качестве начального критерия выбран (1) размер cDNA, в качестве сопровождающих – (2) размер 5'-UTR и (3) GC-состав выше определенного значения. Результирующая выборка пользователя (4) находится на пересечении всех окружностей и заштрихована.

Для выявления подобных регуляторных кодов применяют *in silico* анализ вышеперечисленных областей мРНК – CDS, 5'-UTR и 3'-UTR.

С целью обнаружения таких регуляторных кодов в мРНК и их корреляции с трансляционной эффективностью мы создали интернет-ресурс JetGene (<https://jetgene.bioset.org/>). Кроме того, JetGene позволяет оценить вариации нуклеотидного состава, частоты использования кодонов, оценить окружение стартового кодона и многое другое.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

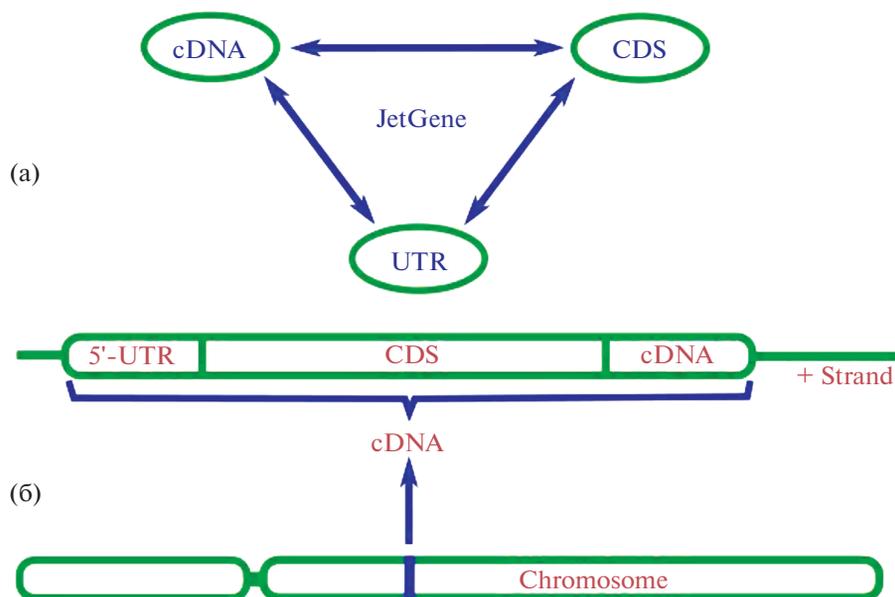
**Мотивация создания JetGene.** При создании JetGene задача состояла в том, чтобы предоставить пользователям, имеющим минимальный опыт в области биоинформатики и/или в программировании, простой и в тоже время удобный инструментарий для анализа и планирования эксперимента. Таким образом, в JetGene собран воедино широкий набор опций, предназначенный для сравнительного анализа последовательностей, который дает возможность (1) оценить вариации длины, нуклеотидного состава, частот использования кодонов, окружение стартового кодона трансляции; (2) выявить и определить статистически значимую представленность потенциальных регуляторных контекстов у мРНК с разной эффективностью трансляции.

Следует отметить, что JetGene содержит последовательности CDS, cDNA, 5'-UTR, 3'-UTR для шести царств живых организмов, включая 45 видов растений. Удобный функциональный

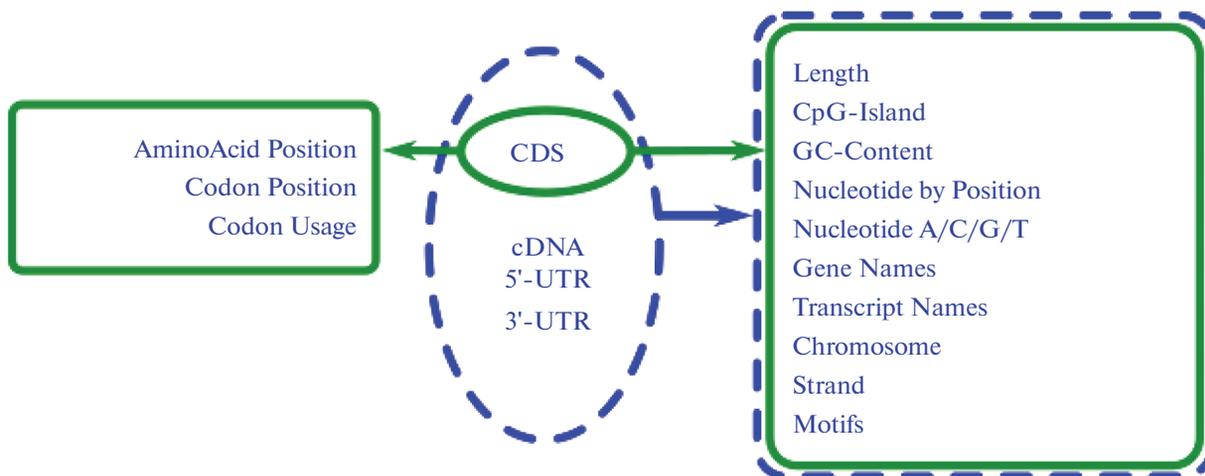
набор инструментов JetGene позволяет проводить исследование как по полноразмерным транскриптам, так и по усеченным транскриптам, а также по кодирующим/некодирующим областям мРНК.

**Алгоритм “Система вложенных выборов”.** Еще одно важное преимущество JetGene заключается в реализации в нем особого алгоритма, названного нами “Система вложенных выборов”. Его суть состоит в том, что на первом этапе работы исследователь выбирает определенный критерий в качестве основного, например, (1) cDNA заданной длины, “cDNA Length”, и формирует главную выборку. На дальнейших этапах анализа он может использовать оставшиеся параметры как дополнительные, например, (2) добавить вспомогательный критерий “5'-UTR Length”, что позволит отобразить из главной выборки последовательности, имеющие определенную длину 5'-UTR, и сформировать выборку последовательностей второго порядка; (3) затем можно добавить следующий параметр, например, поиск по мотиву “Motifs”, в результате которого JetGene выберет последовательности, содержащие указанный мотив из выборки второго порядка. Таким образом, имеется возможность сформировать серию последующих выборов, каждая из которых строится на основе предыдущей без извлечения промежуточных результатов из JetGene (рис. 1). Старшинство критериев (основной и вспомогательные) пользователь может определить по своему усмотрению. В результате исследователь имеет возможность получить различные варианты биологических текстов, удовлетворяющие нетривиальным сочетаниям параметров, при этом количество таких комбинаций не ограничено. Следует подчеркнуть, что как итоговая, так и каждая из промежуточных выборок могут быть экстрагированы из JetGene в fasta-формате на произвольном этапе работы.

**Строение JetGene.** Транскриптомные данные о представителях шести ключевых царств живых организмов, включая растения, загружены с сервера Ensembl <https://www.ensembl.org/> [3] 28 июня 2017 г. и регулярно обновляются в JetGene (раз в неделю). Описание каждого транскриптома содержит информацию о сборке и количестве находящихся в нем последовательностей. Для большинства эукариот главный интерфейс JetGene состоит из четырех основных разделов (“CDS data”, “cDNA data”, “5'-UTR data”, “3'-UTR data”) (рис. 2). Следует отметить, что информация об UTR получена путем вычитания CDS из cDNA. Для ряда организмов приведена геномная онтология (Gene Ontology Annotations, GO) [4]. Раздел GO является вспомогательным. Он не связан с основными разделами и присутствует только в том случае, когда информация о геномной онтологии приведена на сервере Ensembl.



**Рис. 2.** Общая структура JetGene. Стрелки символизируют, что работу можно начать с любого раздела (CDS, cDNA, 5'-URT, 3'-URT) и переходить в любой раздел, не извлекая полученный результат из JetGene (а). Схематическое изображение гена на хромосоме (интроны удалены) (б).



**Рис. 3.** Обзор основных модулей JetGene. Схематически изображены модули, доступные для каждого из разделов “CDS data”, “cDNA data”, “5'-UTR data”, “3'-UTR data”.

JetGene организован в модульной форме. Модули можно использовать как индивидуально, так и применять их последовательно с целью проведения расширенного и непрерывного исследования. Веб-интерфейс содержит 10 основных модулей, свойственных четырем основным разделам, и 3 приложения, присущие разделу “CDS data”. Список модулей, характерных для каждого раздела (“CDS data”, “cDNA data”, “5'-UTR data”, “3'-UTR data”), приведен на рис. 3.

Кроме того, реализована возможность загрузить произвольную выборку нуклеотидных последовательностей и провести последующий анализ (эта опция доступна после бесплатной регистрации). В этом случае не будет показана разметка последовательностей cDNA на CDS, 5'-UTR, 3'-UTR, а последовательности будут интерпретированы JetGene как CDS. Исследователю будут доступны все приложения, за исключением “Chromosome” и “Strand”. Возможность экстрагировать получен-

ные последовательности в fasta-формате на произвольной стадии исследования также сохраняется.

JetGene обладает дружественным интерфейсом. Кроме того, на каждом этапе работы в нем предусмотрена графическая интерпретация результатов проведенного исследования, которая сопровождается статистически обработанными количественными значениями. Это дает возможность сравнить выборку пользователя, созданную в процессе работы, с информацией по всему транскриптому изучаемого организма, и тем самым наглядно проиллюстрировать полученные результаты анализа. Все вышесказанное позволяет выполнить комплексный *in silico* анализ для огромного количества научных направлений. Таким образом, JetGene можно выбрать в качестве отправной точки научных исследований и удобного интернет-ресурса для широкого спектра работ.

Далее мы даем список модулей, характерных для каждого из четырех основных типов данных (“CDS data”, “cDNA data”, “5'-UTR data”, “3'-UTR data”).

Модули, специфичные только для “CDS data”:

1. AminoAcid Position;
2. Codon Position;
3. Codon Usage.

Модули, специфичные для “CDS data”, “cDNA data”, “5'-UTR data”, “3'-UTR data”:

1. CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR Length;
2. CpG-Island in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR;
3. GC-Content in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR;
4. Nucleotide by Position in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR;
5. Nucleotide A/C/G/T in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR;
6. Gene Names;
7. Transcript Names;
8. Chromosome;
9. Strand;
10. Motifs.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Ниже приведено краткое описание модулей, свойственных для каждого из четырех основных разделов JetGene. В таблице (Дополнительные материалы) представлены потенциальные области использования модулей JetGene.

### *Модули, характерные для “CDS data”*

**AminoAcid Position.** В текущей опции реализована возможность отображать аминокислоту, локализованную в позиции 1–10 как с C-, так и с N-концевой области CDS. Она может быть полезна для применения правила “N-конца”, со-

гласно которому время полужизни белка определяется вторым N-концевым аминокислотным остатком его полипептидной цепи, в частности, для дизайна 5'-концевой области целевого гена либо для анализа и конструирования сигнальных пептидов (Дополнительные материалы таблица).

**Codon Position.** Данная утилита аналогична “AminoAcid Position”. Она определяет, какие триплеты расположены в позиции 1–10 с 5'- или с 3'-концевой области CDS. И позволяет, например, исследовать N-концевую область белка или сигнальных пептидов на нуклеотидном уровне.

**Codon Usage.** Текущий модуль показывает триплеты, кодирующие аминокислоты в CDS, а также их численный и процентный состав (за 100% принимается сумма всех триплетов, кодирующих данную аминокислоту, а не сумма всех кодонов по CDS). Он позволяет исследовать полноразмерные CDS или их усеченный вариант (опция “Sequence region to calculate data (%)”). Кроме того, в этом модуле предусмотрена возможность загрузить и проанализировать любую нуклеотидную последовательность. Подобная утилита может оказаться полезна в случае, когда экспериментатору необходимо сконструировать целевую последовательность таким образом, чтобы ее кодонный состав был схож с кодонным составом генома хозяина, что, в свою очередь, приводит к увеличению уровня трансляции целевого белка (Дополнительные материалы, таблица).

### *Модули, характерные для “CDS data”, “cDNA data”, “5'-UTR data”, “3'-UTR data”*

**CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR Length.** Эта опция дает распределение всех последовательностей CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR по длинам в изучаемом организме. Кроме этого, имеется возможность выбрать последовательности определенной длины (разбивка ведется с шагом по 500 н.), либо задать диапазон, интересующий пользователя, на линейке “Values interval to calculate data”. Данное приложение может быть использовано при подборе целевых генов максимальной длины, которые можно клонировать в выбранный вектор, или в исследованиях по оценке взаимосвязи между длиной 5'-UTR и эффективностью трансляции мРНК (Дополнительные материалы, таблица). Например, в исследовании взаимосвязи между длиной 5'-UTR и нагрузкой транскриптов рибосомами у *Arabidopsis thaliana* было продемонстрировано, что (1) длина 5'-UTR 50–75 н. обеспечивает оптимальную нагрузку рибосомами, а (2) короткие 5'-UTR (менее 25 н.) и длинные 5'-UTR (175–300 н.) могут ингибировать нагрузку транскрипта рибосом, т.е. установлена общая закономерность влияния длины 5'-UTR на трансляционный статус мРНК (Дополнительные материалы, таблица).

**CpG-Island in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR.** Данная утилита позволяет исследовать CpG-острова и вычислить процент CpG в CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR. Она анализирует как полноразмерные последовательности, так и их усеченные варианты (опция “Sequence region to calculate data (%)”). Этот модуль дает возможность отобрать все последовательности, для которых процент CpG-Island попадает в интервал, заданный пользователем (опция “Values interval to calculate data”). Такой анализ может быть полезен для изучения различий в метилировании CpG-богатых последовательностей из разных организмов, в том числе растений (Дополнительные материалы, таблица).

**GC-Content in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR.** Описываемая утилита аналогична “GpC-Island in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR”, но учитывает все G и C нуклеотиды, входящие в состав транскриптов. Имеется возможность выбрать все транскрипты, обладающие определенным GC-составом (разбивка ведется с шагом 1%). Она может быть применена в исследованиях по оценке распределения содержания динуклеотидов GC в кодирующих последовательностях, что может сказываться на эффективности экспрессии генов с различным соотношением GC динуклеотидов (Дополнительные материалы, таблица).

**Nucleotide by Position in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR.** Указанный модуль показывает, какой нуклеотид расположен в позиции 1–10 как с 5'- так и с 3'-концевой области CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR. Он может быть полезен в сравнительных исследованиях полных геномов растений для выявления взаимосвязи между высококонсервативными позициями (преобладанием повторов трех нуклеотидов вокруг старта инициации трансляции – TIS) и уровнем белка (Дополнительные материалы, таблица). Например, такой анализ позволил установить самые сильные детерминанты эффективности трансляции у растений, расположенные в непосредственной близости от стартового кодона: A/G<sup>-3</sup> и G<sup>+4</sup> [или A/G<sup>-3</sup>N<sup>-2</sup>N<sup>-1</sup>AUG и AUGG<sup>+4</sup>]. В сходных исследованиях убедительно продемонстрировано, что C<sup>+5</sup> важен для эффективности трансляции, а на примере различных генов *A. thaliana* выяснено, что область от позиции –5 до –1 является наиболее важной для эффективности трансляции. При этом нуклеотиды A наиболее благоприятны, а нуклеотиды T неблагоприятны для трансляции, когда они локализованы в позициях от –4 до –1 в 5'-UTR (Дополнительные материалы таблица).

**Nucleotide A/C/G/T in CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR.** Текущая опция определяет процентное содержание нуклеотида A/C/G/T в CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR. Она анализирует как полноразмерные последовательности, так и их усеченные варианты (опция “Sequence region to calculate data

(%)”). Имеется возможность выбрать все последовательности, для которых процент нуклеотида A/C/G/T попадает в интервал, заданный пользователем (опция “Values interval to calculate data”). Данная утилита позволяет сформировать для анализа выборки последовательностей, характеризующихся определенным нуклеотидным составом. Данное приложение может быть использовано в исследованиях, в которых необходимо установить взаимосвязь между композицией моно- и динуклеотидов в 5'-UTR и нагрузкой транскриптов рибосомами у растений (Дополнительные материалы таблица). В частности, для *A. thaliana* показано, что: (1) мРНК с высокой рибосомной нагрузкой обычно имели 5'-UTR с высоким содержанием аденина (A) и динуклеотидов AU и AC; (2) плохо нагруженные рибосомами мРНК обычно имели 5'-UTR с повышенным содержанием гуанина (G), и динуклеотида GU (Дополнительные материалы, таблица).

**Gene Names.** Этот модуль позволяет выбрать все последовательности, имеющие имя или общую часть имени. Дополнительно имеется возможность загружать выборку пользователя по именам генов, если данные по исследуемому организму охвачены JetGene. Следует отметить, что в этом случае пользователю будут доступны все разделы JetGene.

**Transcript Names.** Текущее приложение аналогично “Gene Names”, но при этом пользователь может найти как уникальный транскрипт(ы), так и все транскрипты, относящиеся к одному гену или имеющие общую часть имени гена, введенного пользователем в строку поиска. Модуль позволяет легко выявить все изоформы изучаемого гена и проанализировать наличие различий между ними.

**Chromosome.** Указанная опция показывает распределение последовательностей по хромосомам, а также на митохондриальной ДНК. Она может быть полезна в случае, когда пользователя интересуют последовательности, локализованные на определенной хромосоме, либо при сравнении данных, полученных для двух разных хромосом.

**Strand.** Эта подпрограмма дает возможность выяснить, какие CDS локализованы на прямой, а какие – на обратной цепи ДНК, и быстро разделить всю выборку на две соответствующие части. Для бактерий такая нехитрая процедура позволяет выявить ошибочное предписание генов к одному оперону. Кроме того, она может быть полезна в работах по оценке длины генов в зависимости от их расположения на лидирующей (прямой) или на запаздывающей (обратной) цепях (Дополнительные материалы таблица).

**Motifs.** Указанный модуль позволяет провести поиск последовательностей, содержащих определенные мотивы, в том числе одновременно не-

сколько мотивов, указанных пользователем (оператор AND), или хотя бы один из них (оператор OR). Анализ можно проводить как по полноразмерным последовательностям, так и по области, ограниченной пользователем. Результаты выводятся в виде гистограммы, отображающей частоту встречаемости мотива по блокам, на которые разбиваются последовательности. Для каждого введенного мотива исследователь имеет возможность указать определенные блоки в таблице. В этом случае выборка будет ограничена теми генами, в которых мотив встречается в указанных регионах. Описанный модуль может быть полезен при выявлении мотивов внутри регуляторных последовательностей, определении их функционального значения в обеспечении уровня экспрессии целевого гена(-ов) и при конструировании синтетических регуляторных последовательностей (Дополнительные материалы таблица). Как, например, в исследовании 5'-UTRs из 15 971 гена *A. thaliana*, в котором выявлены мотивы TAGGGTTT и AAAACCCT, характерные для многих генов. Это потенциально указывает на их вклад в эффективность трансляции. Транскриптомное сравнение мРНК, не связанных с полисомами, и полисомных мРНК убедительно показало наличие светового запуска трансляционного контроля для транскриптов, имеющих один из этих двух мотивов в 5'-UTR, но не для транскриптов, представленных на высоком уровне. Данное наблюдение позволило предположить, что трансляционный контроль за счет элементов, перечисленных выше, может обеспечивать дифференциальную трансляцию мРНК. Дополнительно авторы продемонстрировали, что мотивы TAGGGTTT и AAAACCCT, представляющие собой цис-элементы, могут играть роль в трансляционном управлении, в то время как *A. thaliana* реорганизуется протеомом в ответ на внешние экологические стимулы. Дальнейшие исследования экспериментально доказали, что мотив TAGGGTTT регулирует экспрессию гена именно на трансляционном уровне. Необходимо отметить, что комплементарность последовательностей этих двух элементов позволила предположить, что они могут функционировать в процессе контроля трансляции за счет формирования шпилеподобной структуры на мРНК. Однако, изучение появления этих мотивов в 5'-UTR транскриптов, кодирующих строго подтвержденные белковые продукты, позволило выявить только 4 гена, содержащие оба этих мотива AAAACCCT и TAGGGTTT. Таким образом, структура спаривания оснований, образованная этими двумя цис-элементами, не может объяснить трансляционную регуляцию большинства транскриптов. Кроме того, доказано, что эти два элемента могут независимо участвовать в контроле трансляции.

## ОБСУЖДЕНИЕ

**Сравнение с другими базами данных.** Мы разработали интернет-ресурс JetGene, который очень прост в использовании и ориентирован не только на опытных биоинформатиков, но и на экспериментаторов, имеющих ограниченные знания в *in silico* анализе и в программировании. Сравним его с другими веб-ресурсами.

В настоящее время биологические тексты последовательностей хранятся на серверах различных источников. Наиболее часто в них представлена CDS и соответствующая ей аминокислотная последовательность, как, например, в GenBank [5] или в KEGG [6]. В отличие от JetGene, они содержат различные вспомогательные опции, такие как карты метаболических путей, пакет программ Blast [7] для поиска гомологичных последовательностей, список публикаций, ссылки на внешние интернет-ресурсы, дающие всестороннее описание изучаемого гена или белка, и многое другое. Несмотря на разносторонность представленной информации, при работе с подобными онлайн-ресурсами выбор последовательностей возможен только на самом тривиальном уровне: найти последовательность с заданной функцией или гомологичную данной.

Далее следует остановиться на ресурсах, позволяющих проводить комплексный поиск последовательностей. К ним относится Ensembl <https://www.ensembl.org/> [3], который послужил основой для JetGene. Следует отметить, что вся информация о нуклеотидных последовательностях, представленных в Ensembl, содержится в JetGene. В настоящее время Ensembl представляет собой один из важнейших интернет-ресурсов, в котором хранится информация об аннотации генов, генетике, сравнительной геномике и эпигеномике для колоссального количества живых организмов. Для многих из них представлен не один, а несколько вариантов сборки генома. Возможности использования Ensembl варьируются от быстрого просмотра данных до биоинформатического анализа в масштабах всего генома. При этом, чтобы обеспечить доступ к сведениям, интересующим пользователя, Ensembl предлагает доступ через BioMart [8], через различные языки программирования и REST APIs [9, 10] или через FTP. Однако BioMart не в полной мере использует информацию, хранящуюся в Ensembl (например, отображает малую часть организмов, информация о которых содержится в Ensembl), а использование REST APIs и FTP требует навыков программирования, которыми обладают не все заинтересованные пользователи.

BioMart дает возможность работать отдельно с CDS, cDNA, 5'-UTR, 3'-UTR, а также с белковыми последовательностями. Для поиска нужной информации пользователь может составить набор фильтров таким образом, чтобы охватить ши-

рокий диапазон данных, начиная от положения последовательности на хромосоме и заканчивая фенотипом организма. Общая информация, хранящаяся в BioMart, существенно превосходит тот объем информации, который содержится в JetGene. Набор опций BioMart также заметно превышает набор модулей JetGene. В частности, BioMart позволяет задать координаты на хромосоме, получить информацию об интрон-экзонной структуре, найти ортологи в других организмах и многое другое. При этом пересечение опцией между BioMart и JetGene незначительное. В частности, BioMart, как и JetGene, позволяет выбрать хромосому для анализа, осуществить поиск по “gene ID”, дает возможность отобразить последовательности CDS, cDNA, 5'-UTR, 3'-UTR и получить их в fasta-формате, сделать поиск по GO. При этом, столь важная для исследователя информация, как, например, длина последовательности, ее GC-состав, локализация изучаемой последовательности на прямой/обратной цепи и т.д., отображается исключительно в результирующем файле. Дальнейший отбор последовательностей по каждому из вышеперечисленных параметров необходимо делать вручную. Следует упомянуть, что часть информации, например, процентное содержание нуклеотида А/С/Г/Т или какой нуклеотид расположен в позиции 1–10, распределение триплетов внутри исследуемой выборки последовательностей, не предоставлена в BioMart ни в виде опций, ни в результирующем файле. Кроме того, возможность работать с усеченными последовательностями представлена в BioMart не столь наглядно как в JetGene, а графическая интерпретация результатов по выбранному параметру отсутствует. Также существует ряд ограничений при попытке сделать несколько итераций работы или при попытке осуществить переход CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR. Т.е., например, затруднительно перейти напрямую от анализа 5'-UTR к анализу cDNA, в которых они содержатся, без дополнительных вспомогательных действий.

UCSC Genome Browser <https://genome.ucsc.edu/> [11], представляет собой еще один веб-ресурс, позволяющий сделать комплексный поиск и анализ последовательностей. Он содержит данные более чем для 100 видов, причем для ряда из них предложено несколько вариантов сборки. При этом UCSC Genome Browser охватывает меньше царств, чем JetGene, а в каждом из них содержится меньше организмов, чем в JetGene. Например, в нем отсутствуют сведения о растениях, а информация о грибах приведена только для *Saccharomyces cerevisiae*. Для отбора последовательностей по критериям, интересующим пользователя, и для получения выборки в fasta-формате, исследователь может использовать опцию UCSC Table Browser, который, подобно JetGene, позволяет составить выборку последовательностей по нескольким пара-

метрам и экстрагировать ее в fasta-формате. Тем не менее, настройки Table Browser менее наглядны, чем настройки JetGene. Для того чтобы суметь сформировать корректный запрос, загрузить свои данные или использовать информацию, представленную в этом интернет-ресурсе, а также применить несколько критериев запроса и составить пересечение/объединение данных между собой, исследователь должен обладать определенными биоинформатическими знаниями. Ему необходимо изучить структуру формата входных/выходных данных и описание фильтров. Более того, пользователю требуется подготовить материал, на основе которого будет строиться пересечение критериев. При регулярном решении одинаковых задач это оправдано. Тем не менее, изучение настроек занимает значительное время при быстро меняющихся задачах, а также при подборе последовательностей по широкому спектру критериев. Следует отметить, что графическая интерпретация в UCSC Table Browser не представлена.

В то же время данные из UCSC Table Browser можно экспортировать непосредственно в открытую веб-платформу Galaxy <http://usegalaxy.org> [12]. Это занимает дополнительное время. При этом ряд ее опций совпадает с утилитами JetGene (например, анализ CDS, cDNA, 5'-UTR, 3'-UTR, анализ GC-состава, возможность выбрать последовательности определенной длины, возможность исследовать как полноразмерные последовательности, так и определенные участки целевых последовательностей, получить последовательности в fasta-формате и т.д.), но прописаны они не столь наглядно, как в JetGene. Также стоит отметить, что, как в Galaxy, так и в JetGene, нет ограничений на осуществление перехода между CDS/cDNA/5'-UTR/3'-UTR в процессе анализа. Но в Galaxy подобного рода переходы осуществляются менее тривиально и занимают больше времени, чем в JetGene.

**Использование JetGene.** Успешное применение JetGene (ранее база данных назвалась FlowGene) продемонстрировано в нескольких наших исследованиях. Так, в работе [13] изучен уровень транскрипции генов у растений в зависимости от нуклеотидного состава 5'-UTR. В ней применен алгоритм “Система вложенных выборок”. Основным критерием был выбран размер последовательностей не менее 200 н. (минимальный размер CpG-островка) (1). В качестве дополнительных критериев приняли: (2) GC-содержание выше 50% (одна из характеристик CpG-остроек); (3) нуклеотиды, окружающие стартовый кодон, в положении –3 и +4, согласно последовательности Kozak; (4) отсутствие альтернативных стартовых и терминирующих кодонов. Далее в результирующей выборке искали 6-мерные мотивы, которые встречались не менее чем у 50% анализируемых последовательностей. Впоследствии эти мотивы были включены в дизайн синтетической последо-

вательности и было получено экспериментальное подтверждение того, что 5'-области генов с высоким содержанием динуклеотидов CpG могут способствовать увеличению уровня транскрипции генов у растений. Еще в одном исследовании оптимизация кодового состава *gox* гена *Penicillium funiculosum* с использованием ресурса JetGene позволила достичь эффективной экспрессии этого гена в растениях *Solanum tuberosum*, и как следствие обеспечить устойчивость к фитопатогену [14]. В другой работе [15] с применением алгоритмов ресурса JetGene проведен *in silico* анализ двух групп транскриптов с разной трансляционной эффективностью, что позволило установить, что пиримидиновые динуклеотиды и мотивы характерны для 5'-нетранслируемой области мРНК с высокой трансляционной эффективностью, тогда как пуриновые динуклеотиды и мотивы ассоциированы с транскриптами, имеющими низкую трансляционную эффективность.

Колебания нуклеотидного состава отмечены в геномах всех организмов, включая растения, и определяют эффективность экспрессии генов каждого вида [16, 17]. Знание точных механизмов регуляции является ключевым для понимания того, что заставляет организмы переключать гены. Использование информации о вариациях нуклеотидного состава важно при разработке противовирусных вакцин [18], дает возможность успешно оптимизировать последовательность целевого гена под кодоновый состав организма-хозяина, предсказать гены на основе геномных последовательностей [19], конструировать вырожденные праймеры [20] и многое другое. Изучение колебаний нуклеотидного состава занимает центральную позицию в таких важных областях как молекулярная эволюция [21] и биотехнология [22]. Наличие полногеномных последовательностей дает уникальную возможность определить закономерности в распределении различных свойств [23] как по всему геному, так и по областям отдельного транскрипта. Так, например, была выявлена связь между нуклеотидным составом и трансляцией белка [24, 25], уровнем экспрессии генов [26, 27], показано изменение нуклеотидного состава в зависимости от локализации последовательности в клетке [28], обнаружено влияние третьей позиции в кодоне в эффективность трансляции мРНК [29] и др.

Успех в проведении подобного рода исследований в значительной мере зависит от возможности сформировать наборы биологических текстов последовательностей, исходя из широкого ряда критериев, а также от возможности определить статистически значимые свойства в их распределении. Чем больше число параметров, участвующих в анализе, тем выше потенциал для создания и манипуляций выборками. Следовательно, тем шире потенциал для поиска и выявления характе-

ристик, оказывающих влияние на биологические свойства последовательностей. В соответствии со всеми вышеперечисленными требованиями, нами разработан интернет-ресурс JetGene, который позволяет быстро и эффективно проводить анализ подобного рода. Следует отметить, что в настоящее время он дает наиболее полное представление о структурно-функциональном потенциале биологического текста. JetGene разработан для анализа исключительно нуклеотидных последовательностей и ориентирован на исследователей-экспериментаторов, не имеющих каких-либо специальных навыков в области *in silico* анализа или в программировании. Его уникальность заключается в том, что любой пользователь способен в кратчайшие сроки прозондировать огромные массивы информации, имеющиеся у него в распоряжении. Или составить *de novo* различные наборы последовательностей, удовлетворяющие задачам эксперимента, и быстро их проанализировать. Таким образом, исходя из критериев, интересующих пользователя, варьируя широким диапазоном параметров, можно провести полноценное биоинформационное исследование, составить выборку нуклеотидных последовательностей и извлечь ее из JetGene. Следует отметить, что графическая визуализация результатов сопровождает каждый шаг анализа и существенно облегчает работу пользователя.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 18-14-00026.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldenkova-Pavlova I.V., Pavlenko O.S., Mustafaev O.N., Deyneko I.V., Kabardaeva K.V., Tyurin A.A. Computational and experimental tools to monitor the changes in translation efficiency of plant mRNAs on a genome-wide scale: advantages, limitations, and solutions // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 33. <https://doi.org/10.3390/ijms20010033>
2. Kabardaeva K.V., Tyurin A.A., Pavlenko O.S., Gra O.A., Deyneko I.V., Kouchoro F., Mustafaev O.N., Goldenkova-Pavlova I.V. Fine tuning of translation: a complex web of mechanisms and its relevance to plant functional genomics and biotechnology // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 835. <https://doi.org/10.1134/s1021443719060074>
3. Yates A.D., Achuthan P., Akanni W., Allen J., Allen J., Alvarez-Jarreta J., Amode M.R., Armean I.M., Azov A.G., Bennett R., Bhai J., Billis K., Boddu S., Marugán J.K., Cummins C. et al. Ensembl 2020 // *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48. P. D682. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz966>
4. Carbon S., Douglass E., Dunn N., Good B., Harris N.L., Lewis S.E., Mungall C.J., Basu S., Chisholm R.L., Dodson R.J., Hartline E., Fey P., Thomas P.D., Albou L.P., Ebert D. et al. The Gene Ontology Resource: 20 years

- and still GOing strong // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. D330.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>
5. Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. D37.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1070>
  6. Kanehisa M. KEGG bioinformatics resource for plant genomics and metabolomics // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1374. P. 55.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3167-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3167-5_3)
  7. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389.  
<https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
  8. Kinsella R.J., Kähäri A., Haider S., Zamora J., Proctor G., Spudich G., Almeida-King J., Staines D., Derwent P., Kerhornou A., Kersey P., Flicek P. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space // *Database (Oxford)*. 2011. V. 2011. P. bar030  
<https://doi.org/10.1093/database/bar030>
  9. Yates A., Beal K., Keenan S., McLaren W., Pignatelli M., Ritchie G.R., Ruffier M., Taylor K., Vullo A., Flicek P. The Ensembl REST API: Ensembl data for any language // *Bioinformatics*. 2015. V. 31. P. 143.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu613>
  10. Ruffier M., Kähäri A., Komorowska M., Keenan S., Laird M., Longden I., Proctor G., Searle S., Staines D., Taylor K., Vullo A., Yates A., Zerbino D., Flicek P. Ensembl core software resources: storage and programmatic access for DNA sequence and genome annotation // *Database (Oxford)*. 2017. V. 2017. P. bax020.  
<https://doi.org/10.1093/database/bax020>
  11. Hung J.H., Weng Z. Visualizing genomic annotations with the UCSC Genome Browser // *Cold Spring Harb Protoc.* V. 2016. P. 2016.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot093062>
  12. Goecks J., Nekrutenko A., Taylor J., Team G. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences // *Genome Biol.* 2010. V. 11. P. R86.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-8-r86>
  13. Tyurin A., Kabardaeva K., Gra O., Mustafaev O., Sadvovskaya N., Pavlenko O., Goldenkova-Pavlova I. Efficient expression of a heterologous gene in plants depends on the nucleotide composition of mRNA's 5'-region // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 511.  
<https://doi.org/10.1134/s1021443716030158>
  14. Савчин Д.В., Вересова Т.Н., Межнина О.А., Пянюш А.С., Вячеславова А.О., Голденкова-Павлова И.В. Оптимизация кодонового состава грибного гена *gox Penicillium funiculosum* для эффективной экспрессии в растениях *Solanum tuberosum* // *Вестн НАН Беларуси. Сер. біял. навук.* 2015. № 1. С. 50.
  15. Kabardaeva K.V., Turin A.A., Kouchoro F., Mustafaev O.N., Deineko I.V., Fadeev V.S., Goldenkova-Pavlova I.V. Regulatory contexts in the 5'-region of mRNA from *Arabidopsis thaliana* plants and their role in translation efficiency // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 425.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443720030139>
  16. Quax T., Claassens N., Söll D., van der Oost J. Codon bias as a means to fine-tune gene expression // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. P. 149.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.035>
  17. Song H., Gao H., Liu J., Tian P., Nan Z. Comprehensive analysis of correlations among codon usage bias, gene expression, and substitution rate in *Arachis duranensis* and *Arachis ipaënsis* orthologs // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 14853.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13981-1>
  18. Lingemann M., Liu X., Surman S., Liang B., Herbert R., Hackenberg A., Buchholz U., Collins P., Munir S. Attenuated human parainfluenza virus type 1 expressing Ebola virus glycoprotein GP administered intranasally is immunogenic in African green monkeys // *J. Virol.* 2017. V. 91. P. e02469-16.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02469-16>
  19. Picardi E., Pesole G. Computational methods for ab initio and comparative gene finding // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 609. P. 269.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-241-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-241-4_16)
  20. Zhou T., Gu W., Ma J., Sun X., Lu Z. Analysis of synonymous codon usage in H5N1 virus and other influenza A viruses // *Biosystems*. 2005. V. 81. P. 77.  
<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2005.03.002>
  21. Kim N., Lim S., Chae H., Park Y. Complete mitochondrial genome of the Amur hedgehog *Erinaceus amurensis* (Erinaceidae) and higher phylogeny of the family Erinaceidae // *Genet. Mol. Res.* 2017. V. 16.  
<https://doi.org/10.4238/gmr16019300>
  22. Kinkema M., Geijskes J., Delucca P., Palupe A., Shand K., Coleman H., Brinin A., Williams B., Sainz M., Dale J. Improved molecular tools for sugar cane biotechnology // *Plant Mol Biol.* 2014. V. 84. P. 497.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-013-0147-8>
  23. Chaney J., Clark P. Roles for synonymous codon usage in protein biogenesis // *Annu Rev Biophys.* 2015. V. 44. P. 143.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034333>
  24. Tuller T., Carmi A., Vestigian K., Navon S., Dorfan Y., Zaborske J., Pan T., Dahan O., Furman I., Pilpel Y. An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation // *Cell.* 2010. V. 141. P. 344.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.031>
  25. Saunders R., Deane Ch.M. Synonymous codon usage influences the local protein structure observed // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 6719.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq495>
  26. Whittle C., Extavour C. Expression-linked patterns of codon usage, amino acid frequency, and protein length in the basally branching arthropod *Parasteatoda tepidariorum* // *Genome Biol Evol.* 2016. V. 8. P. 2722.  
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw068>
  27. Tian J., Yan Y., Yue Q., Liu X., Chu X., Wu N., Fan Y. Predicting synonymous codon usage and optimizing the heterologous gene for expression in *E. coli* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 9926.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10546-0>
  28. Diamant A., Pinter R., Tuller T. Three-dimensional eukaryotic genomic organization is strongly correlated with codon usage expression and function // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 5876.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms6876>
  29. Shen W., Wang D., Ye B., Shi M., Ma L., Zhang Y., Zhao Zh. GC3-biased gene domains in mammalian genomes // *Bioinformatics*. 2015. V. 31. P. 3081.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv329>

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

УДК 581.1

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ДОЛГОВРЕМЕННОЕ  
ХРАНЕНИЕ ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ ТАБАКА С КОНСТИТУТИВНОЙ  
ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ *ATGSTF11*<sup>1</sup>

© 2021 г. Х. Г. Мусин<sup>а</sup>, В. В. Федяев<sup>б</sup>, Б. Р. Кулуев<sup>а, б, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Башкирский государственный университет”, Уфа, Россия

\*e-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 17.09.2020 г.

После доработки 17.12.2020 г.

Принята к публикации 20.12.2020 г.

Одной из актуальных задач современной биотехнологии растений является получение стрессоустойчивых растительных культур волосовидных (бородатых) корней и разработка технологий их длительного хранения без частых пересадок и использования дорогостоящих и трудоемких методов криоконсервации. В противодействии стрессовым факторам у растений важнейшую роль выполняет антиоксидантная система, одним из компонентов которой являются глутатион-S-трансферазы. В настоящей работе нами были созданы и исследованы волосовидные корни табака с конститутивной экспрессией гена глутатион-S-трансферазы *AtGSTF11 Arabidopsis thaliana*. Волосовидные корни табака, содержащие данный трансген, характеризовались большим накоплением массы, а также более высокой устойчивостью при действии засоления, тяжелых металлов и теплового стресса. Также трансгенные волосовидные корни обладали более длительной выживаемостью при длительном хранении без пересадок на свежую питательную среду. Конститутивная экспрессия гена *AtGSTF11* в культурах волосовидных корней в стрессовых условиях сопровождалась снижением содержания перекиси водорода, пролина и малонового диальдегида, а также повышением скорости продукции супероксид-аниона и общей антиоксидантной способности.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, волосовидные корни, глутатион-S-трансферазы, *AtGSTF11*, тепловой стресс, засоление, кадмий

**DOI:** 10.31857/S0015330321040102

## ВВЕДЕНИЕ

Растения постоянно подвергаются воздействию стрессовых факторов биотической и абиотической природы. Универсальным процессом, который запускается на фоне развития любого стресса, является накопление активных форм кислорода (АФК). Избыток АФК приводит к деградации липидных мембран, ДНК, белков и блокирует работу многих ферментов. Защита от вредного воздействия и контроль уровня АФК обеспечивается многокомпонентной антиоксидантной системой. Одним из составляющих этой системы является суперсе-

мейство ферментов глутатион-S-трансфераз (GST), которые, используя трипептид глутатион (GSH) в качестве косубстрата, осуществляют восстанавливающие реакции [1]. Глутатион-S-трансферазы обычно подразделяют на 14 классов, а ферменты, относящиеся к этим классам, различаются как по строению, так и по выполняемым функциям [2]. Большой интерес представляют GST класса phi (GSTF), выполняющие множество функций: конъюгация глутатиона с ксенобиотиками [3], связывание тяжелых металлов [4], регуляция свет-опосредованного синтеза глутатиона [5], нейтрализация продуктов перекисного окисления липидов [6]. В последние годы накапливаются данные, свидетельствующие о позитивном влиянии конститутивной экспрессии глутатион-S-трансфераз не только на стрессоустойчивость, но и на продуктивность трансгенных растений [1, 5]. Исходя из этого, мы предположили, что волосовидные (бо-

<sup>1</sup> К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизованных пользователей по doi: 10.31857/S0015330321040102

**Сокращения:** ОАС – общая антиоксидантная способность, СА – супероксид-анион, СОД – супероксиддисмутаза, GST – глутатион-S-трансферазы, HRs – волосовидные корни.

родатые) корни, сверхэкспрессирующие гены *GST*, тоже могут обладать повышенной продуктивностью и стрессоустойчивостью.

Волосовидные корни (hairy roots; HRs) являются одними из перспективных биотехнологических систем для продуцирования ценных вторичных метаболитов. Кроме того, при помощи HRs можно тестировать эффективность целевых генно-инженерных конструкций и изучать некоторые функции встроенных трансгенов без этапа получения полноценных трансгенных растений, что особенно актуально в случае труднорегенерируемых видов растений. При этом не требуется проведение трудоемких и многолетних работ по получению гомозиготных по трансгену поколений растений. Поэтому HRs могут быть использованы как модельный объект при предварительном тестировании генно-инженерных конструкций, однако о полноценной замене трансгенных растений речь здесь не идет. При этом волосовидные корни, по крайней мере, имеют преимущество перед другими растительными культурами *in vitro*, которое заключается в том, что HRs сохраняют многие морфологические параметры, характерные для нативных корней [7]. Культуры HRs в крупном биотехнологическом производстве могут подвергаться отрицательному влиянию изменений состава среды, температуры, и т.д., поэтому создание не только высокопродуктивных, но и стрессоустойчивых волосовидных корней весьма актуально, что может быть достигнуто также путем переноса генов *GST*.

Ранее нами был клонирован ген *AtGSTF11 Arabidopsis thaliana* (неопубл.). Этот ген и его ортологи в других растениях пока остаются неизученными, но являются потенциальной мишенью в генной инженерии растений для целенаправленного изменения продуктивности и стрессоустойчивости как целых растений, так и культур волосовидных корней. На сегодняшний день эффекты конститутивной экспрессии генов семейства *GST* на рост и стрессоустойчивость волосовидных корней не изучались. Однако работы по повышению стрессоустойчивости HRs посредством генетической модификации имеются. К примеру, трансгенные по двум генам пероксидаз (*tpx1* и *tpx2*) HRs *Nicotiana tabacum* показали повышенную устойчивость к фенолу [8], а внедрение гена протеинкиназы *GmBIN2* в HRs сои повышало их устойчивость к соли и дефициту влаги [9].

Другой актуальной проблемой в биотехнологии HRs является длительное сохранение полученных культур волосовидных корней без частых пересадок на свежую питательную среду. Из-за того, что HRs являются гетеротрофной системой, их необходимо постоянно восполнять органическими и минеральными веществами, а быстрый рост вызывает необходимость частых пересадок, что весьма трудоемко и затратно. Тра-

диционно культуры волосовидных корней сохраняют в жидком азоте, что требует специального оборудования и соответствующих высококачественных реактивов, к тому же выживаемость после таких процедур сильно зависит от вида и очень часто снижается до 10% [10]. Однако длительное хранение волосовидных корней возможно также без использования жидкого азота, к примеру, сообщается о сохранении способности к росту у HRs табака в течение 600 дней хранения при низком содержании сахарозы в питательной среде [11]. При низких положительных температурах (+4°C) удалось сохранить живыми HRs женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* С.А. Меу в течение четырех месяцев без пересадок [12]. Мы предположили, что сверхэкспрессия гена *AtGSTF11* может увеличить процент выживаемости HRs при их длительном культивировании в стрессовых условиях. Целью наших исследований стало получение волосовидных корней табака сверхэкспрессирующих ген *AtGSTF11*, их морфометрический анализ, биохимический анализ антиоксидантной системы и оценка возможности их длительного хранения в стрессовых условиях без использования методов криоконсервации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Создание культур волосовидных корней с конститутивной экспрессией гена AtGSTF11*

Ген *AtGSTF11* (at3g03190; NM\_111189.3) был амплифицирован и клонирован из кДНК *A. thaliana*, используя праймеры: 5'-AGAAAATGGTGGTCAAAGTATATGG-3', 5'-CGGAGGACTACAAGAAC-TACTAGACA-3'. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 с конститутивной экспрессией гена *AtGSTF11* были получены методом агробактериальной трансформации листовых дисков. Семена трансгенных растений табака *35S::AtGSTF11* поколения T<sub>2</sub> с единичной копией трансгена стерилизовали в 75% этиловом спирте (~30 с) и в 2.5% гипохлорите натрия (~5 мин), после чего промывали стерильной дистиллированной водой 5 раз и высаживали в чашки Петри с селективной (200 мг/л антибиотика гиромидина), твердой (7 г/л агара) питательной средой MC (0.5 соли MC, 14 г/л сахарозы, 60 мг/л инозитола, 2 мг/глицина, 1 мг/л тиамин и 1 мг/л никотиновой кислоты). Спустя 20 дней проростки одинаковых размеров, не имеющих морфологических аномалий, высаживали в смесь почвы и вермикулита (3 : 1 соответственно). Растения выращивали в вегетационных сосудах объемом 500 мл при температуре воздуха 24 ± 1°C, освещенности 120 мкмоль × м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> и фотопериоде 16 часов.

Культуры HRs были созданы из листовых эксплантов двухмесячных растений при помощи *Agrobacterium rhizogenes* штамма A4. Агробактерии

**Таблица 1.** Схемы стресс-обработки волосовидных корней

Схема №	1	2	3	4	5	6	7
Стрессовый фактор	Засоление	Засоление	Гипертермия	Гипертермия	Действие тяжелых металлов	Действие тяжелых металлов	Нормальные условия
Состав среды	МС, 150 мМ NaCl	МС, 200 мМ NaCl	МС	МС	МС, 100 мМ CuSO <sub>4</sub>	МС, 100 мМ Cd(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	МС
Температура	+24°C	+24°C	+32°C	+35°C	+24°C	+24°C	+24°C

предварительно выращивали на жидкой селективной среде LB (100 мг/л рифампицина). Экспланты листьев табака стерилизовали с использованием 75% раствора этилового спирта (~1 мин) и 2% раствора гипохлорита натрия (~8 мин). Совместное культивирование листовых эксплантов и агробактерий проводили на твердой (7 г/л агара) среде МС (1 соли МС, 28 г/л сахара, 120 мг/л инозитола, 2 мг/л глицина, 1 мг/л тиамин и 1 мг/л никотиновой кислоты) в течение трех суток при температуре +26°C, после чего листовые экспланты были перенесены на твердую среду МС, содержащую антибиотик цефотаксим (100 мг/л). Все образованные на эксплантах волосовидные корни фрагментами длиной по 1.5–2 см помещались в отдельные чашки Петри со средой МС и содержались при температуре воздуха +24 ± 1°C, в темноте. Был проведен предварительный селективный отбор наиболее активно и стабильно растущих корней. После двух месяцев культивации на селективной среде МС фрагменты HRs вместе с апикальной меристемой (~1.2 см длиной) были пересажены на свежую среду МС.

В качестве контроля, относительно которого делали выводы об эффектах трансгена, выступала линия HRs, созданная из нетрансгенных растений *N. tabacum* сорта *Petit Havana* линии SR1.

#### *ПЦР и ОТ-ПЦР анализ волосовидных корней*

ДНК из волосовидных корней выделяли стандартным СТАВ-методом. Для подтверждения трансгенности созданных HRs использовали классический метод ПЦР с праймерами, представленными в Дополнительных материалах 1, в табл. 1.

Тотальную РНК из волосовидных корней выделяли при помощи тризола, первую цепь кДНК синтезировали с использованием олиго(dT) праймера и M-MuLV обратной транскриптазы (NEB, USA). В качестве референсного гена был использован ген фактора элонгации *EF-1α* (AF120093.1). Полуколичественную ОТ-ПЦР проводили при следующих условиях: 94°C – 1 мин, затем 30 циклов: 94°C 30 с, 53°C 30 с, 72°C 1 мин, финальная элонгация 72°C – 5 мин. Для каждого эксперимента использовали по три контрольных и опытных растения ( $n = 3$ ).

#### *Морфометрический анализ волосовидных корней при действии стрессовых факторов*

Общая схема испытаний на устойчивость культур HRs к стрессовым факторам представлена в таблице 1 и включала 7 различных вариантов обработки. Контрольным вариантом выступали линии волосовидных корней, выращенные в стандартных условиях (табл. 1, схема 7). Все опыты проводились в чашках Петри с агаризованной средой МС. Интенсивность стрессовых факторов была подобрана в ходе предварительных исследований по отношению к волосовидным корням табака без трансгена *AtGSTF11*, таким образом, чтобы она значительно (до 20 раз) замедляла рост, но вызывала гибель не более 10% образцов корней. Морфометрический анализ заключался в измерении среднего прироста длины волосовидных корней на 30 день культивации. Средний прирост рассчитывался как отношение суммы удлинения всех корней к числу корней. Для оценки продуктивности также анализировали прирост сырой и сухой массы корней. Поскольку начальная масса фрагментов корней очень мала (не более 1 мг) им было решено пренебречь. Корни высушивали в сушильном шкафу при 105°C в течение 16 ч. Все испытания велись в 64 биологических повторностях ( $n = 64$ ). Достоверность различий проверяли относительно контрольного варианта волосовидных корней без трансгена *AtGSTF11* по методу Duncan.

#### *Анализ антиоксидантной системы культур HRs*

Для проведения биохимического анализа опосредованных стрессом изменений антиоксидантной системы культуры волосовидных корней выращивали в течение 30 ± 1 дней в условиях действия стресс-факторов. Активность всех ферментативных систем приводили в общепринятых единицах на мг общего растворимого белка. Остальные показатели пересчитывали на г сырой массы HRs. Все биохимические исследования по определению активности антиоксидантной системы проводили в 15 биологических повторностях ( $n = 15$ ). Достоверность различий рассчитывали относительно HRs без трансгена *AtGSTF11* (контрольный вариант) по методу Duncan.

**Таблица 2.** Схемы длительного хранения волосовидных корней

Опыт №	Концентрация сахарозы	Температура хранения	Концентрация NaCl
1	1.8 г/л	24°C	–
2	7.5 г/л	3°C	–
3	7.5 г/л	24°C	250 мМ

Для определения активности СОД применяли метод, основанный на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксид-анионы [13]. Пероксидазную активность определяли по способности полимеризации гваякола до тетрагваякола [13]. Каталазную активность проверяли по скорости деградации молекул перекиси водорода [13]. Количество МДА в навеске определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [13]. Метод определения пролина был основан на работе Khedg с соавт. [14]. Скорость образования супероксид-аниона (СА) определяли акцепторным методом, основанным на определении окрашенного продукта окисления адреналина – аденохрома [15]. Экстракцию перекиси водорода проводили по Chaouch et al. [16], измерение его содержания по Bindschedler с соавт. [17]. Общая антиоксидантная способность (ОАС) оценивалась на метанольных (80%) экстрактах по восстановлению Mo(VI) до Mo(V) при кислотном pH [18]. Содержание общего растворимого белка определяли по методу Бредфорда [13].

#### *Долговременное хранение волосовидных корней*

Для проведения испытаний по длительному хранению культур HRs табака использовали кончики корней, отсеченные от молодой культуры HRs (не более 14 дней роста на свежей среде). Отрезанные кончики корней подвергали воздействию в условиях, описанных в табл. 2. Все опыты проводили в чашках Петри с агаризованной средой МС. Выбор таких параметров длительного хранения HRs объясняется тем, что при действии данных стрессоров рост корней заметно замедлялся (до 90%), но количество погибших корней на 30 день испытаний не превышало 10%. Выживаемость HRs проверяли пересадкой фрагментов корней вместе с апикальной меристемой на свежую стандартную среду МС (табл. 1, схема 7). Перенесшими неблагоприятные условия считали те корни, которые сохраняли способность к росту как минимум в течение первых 15 дней роста на стандартной среде. После 60, 90, 120, 150, 180, 210 и 240 дней культивирования в указанных в табл. 2 условиях корни пересаживали на стандартную среду. Через 15 дней после переноса измеряли удельный прирост и рассчитывали выживаемость культур HRs. В качестве контроля выступали HRs,

которые не участвовали в испытаниях, росли в стандартной среде с ежемесячной пересадкой. Достоверность различий определяли относительно HRs без трансгена *AtGSTF11*. Все испытания по длительному хранению велись в 40 биологических повторностях ( $n = 40$ ).

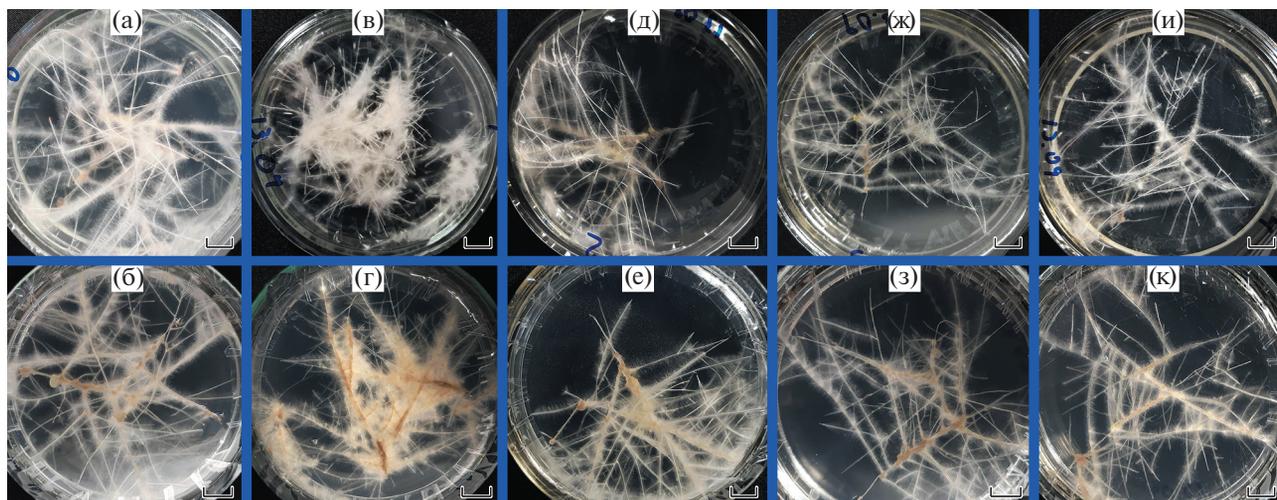
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Получение трансгенных растений и волосовидных корней табака, несущих ген AtGSTF11*

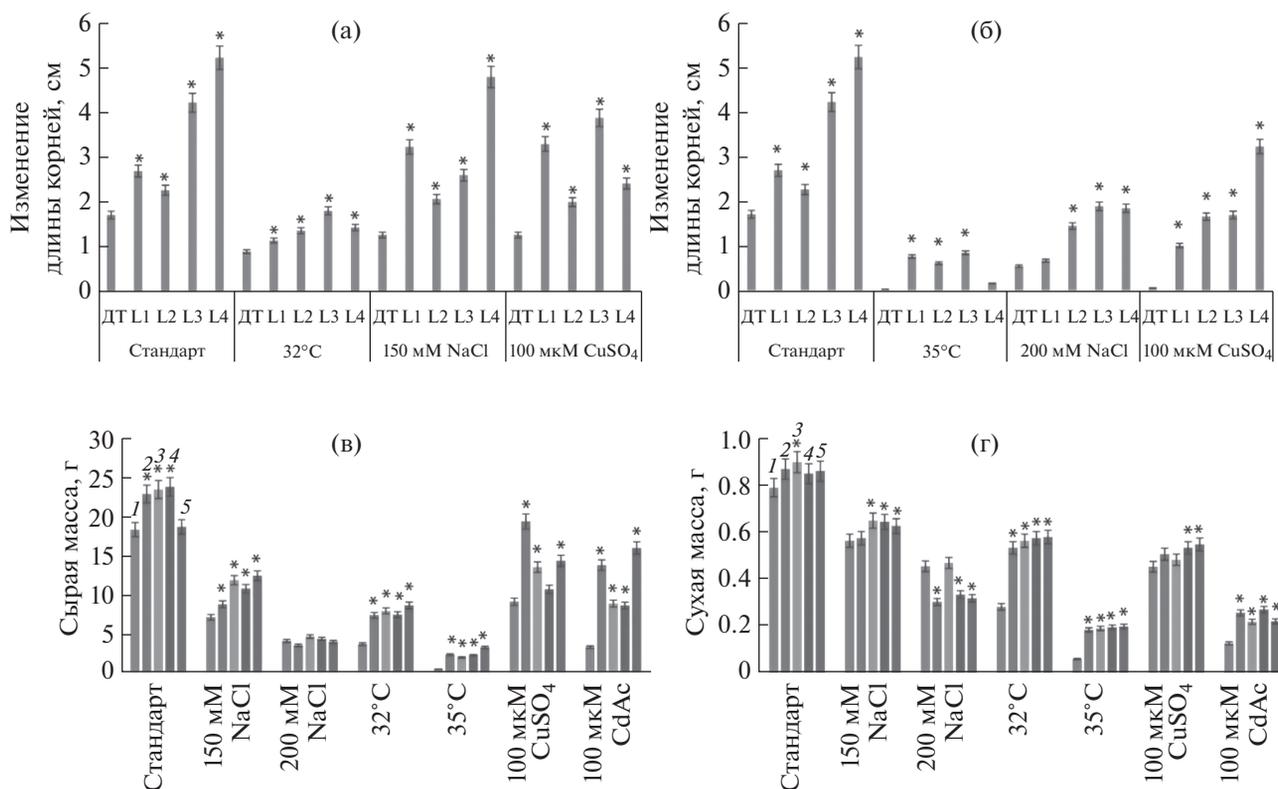
Было получено 14 линий трансгенных растений табака *35S::AtGSTF11*. Наиболее высокий уровень транскрипционной активности целевого гена был обнаружен в линиях 1, 4, 5, 6 и 8: 169, 97, 124, 143, 108% относительно уровня экспрессии референсного гена *EF-1α*, соответственно. Для генетической трансформации при помощи *A. rhizogenes* была отобрана линия 1, характеризующаяся самой высокой транскрипционной активностью гена *AtGSTF11*. После агробактериальной трансформации листовых дисков трансгенных растений табака было получено 76 линий корней *35S::AtGSTF11*. Полученные корни прошли селективный отбор на среде с гигромицином в течение 60 дней. Нами были отобраны культуры, которые не имели обнаруживаемых визуально морфологических патологий (рис. 1). По результатам ПЦР-анализа все отобранные культуры корней имели генетическую конструкцию, содержащую *35S::AtGSTF11*, а также включали гены *rolA* и *rolB*. По результатам полуквантитативной ОТ-ПЦР было отобрано 4 линии HRs (получившие нумерацию L1, L2, L3, L4) с наиболее высоким уровнем транскрипционной активности гена *AtGSTF11*: 108, 116, 127 и 119%, соответственно, относительно уровня экспрессии референсного гена *EF-1α*.

### *Конститутивная экспрессия гена AtGSTF11 повышает продуктивность и стрессоустойчивость HRs*

Морфометрический анализ является наиболее простым и доступным методом оценки продуктивности и стрессоустойчивости культур HRs. Трансгенные HRs табака *35S::AtGSTF11* при стандартных условиях (табл. 1, схема 7) достоверно росли лучше контроля в 2.1 раза (рис. 2а). При действии теплового стресса (32°C) трансгенные линии кор-



**Рис. 1.** Внешний вид испытанных HRs на 30 день культивации в чашках Петри со стандартной МС: (а), (б) – контроль; (в), (г) – линия L1; (д), (е) – линия L2; (ж), (з) – линия L3; (и), (к) – линия L4. Масштаб 10 мм.



**Рис. 2.** Удельный прирост (а, б), а также сырая (в) и сухая (г) масса волосовидных корней табака в условиях теплового стресса (+32°C; +35°C), засоления (150 mM NaCl; 200 mM NaCl) и действия 100 мкМ CuSO<sub>4</sub> и 100 мкМ Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. 1 – дикий тип, 2 – линия L1, 3 – линия L2, 4 – линия L3, 5 – линия L4. Звездочками (\*) обозначены достоверные различия от контроля согласно тесту Duncan ( $P < 0.05$ ).

ней росли достоверно хуже в среднем в 2.5 раза, чем при стандартных условиях, но превышали по этому параметру контрольные варианты (в 2 раза). На среде с 150 mM NaCl (табл. 1, схема 1) скорость роста трансгенных HRs также была больше, чем в

контроле. При действии 100 мкМ CuSO<sub>4</sub> все четыре линии трансгенных HRs табака росли лучше в среднем в 2.3 раза, чем контрольные варианты. После анализа полученных результатов трансгенные линии HRs подвергли воздействию стресса

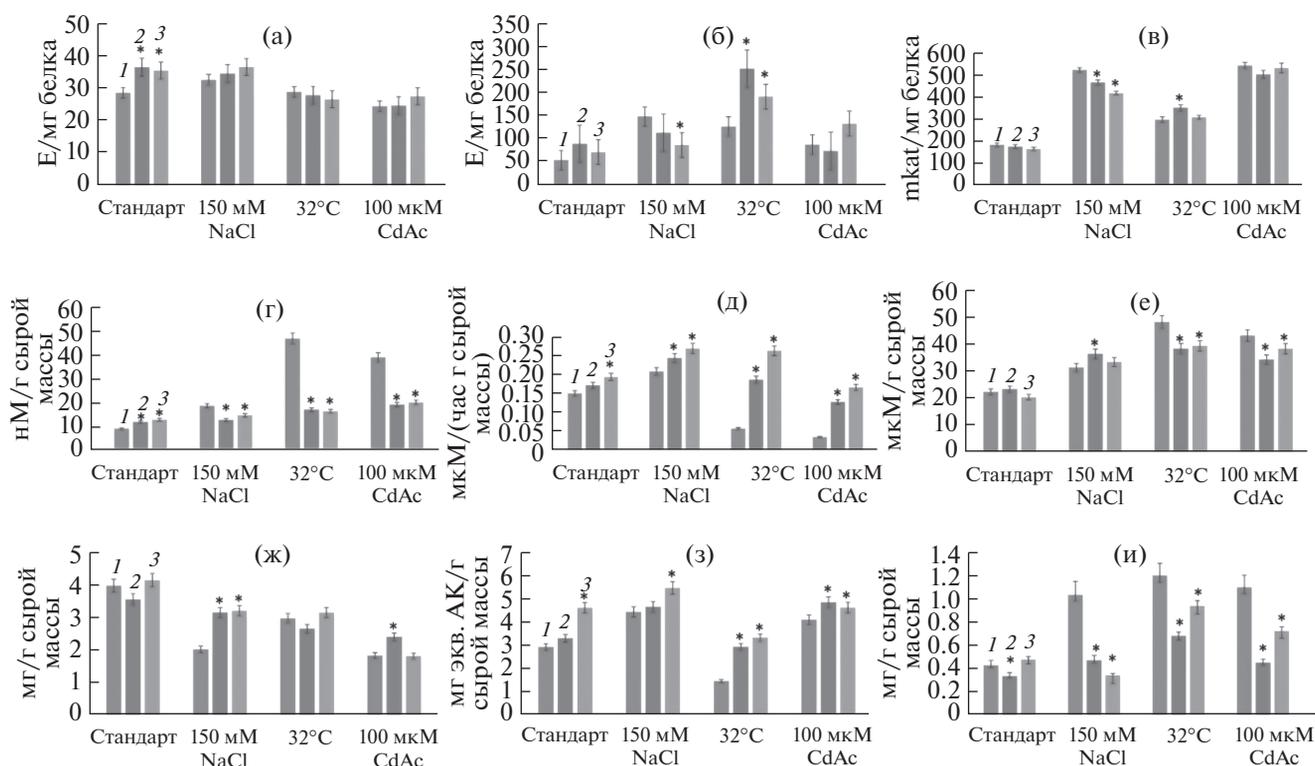
большей интенсивности (табл. 1, схемы 2, 4, 6). Достоверное уменьшение скорости роста в длину всех исследованных HRs происходило при действии  $+35^{\circ}\text{C}$  (рис. 2б). Однако трансгенные линии HRs при таком температурном стрессе росли в длину лучше, чем контроль в среднем в 18 раз. На среде с 200 мМ NaCl мы наблюдали резкое снижение роста как контрольных, так и трансгенных корней (рис. 2б). Тем не менее скорость роста трансгенных линий L3 и L4 достоверно была выше контроля в среднем в 2.8 раза. При действии 100 мкМ Cd ( $\text{CH}_3\text{COO}$ )<sub>2</sub> (CdAc) выявлено значительное угнетение роста в длину HRs всех линий. При этом трансгенные линии HRs росли лучше, чем контроль в среднем в 30 раз (рис. 2б). В стандартных условиях (табл. 1, схема 7) сырая масса трансгенных HRs линий L1, L2, L3 была в среднем на 28% больше контроля (рис. 2в). При действии 150 мМ NaCl сырая масса корней линий L2, L3, L4 была значительно больше контроля, однако при действии более высокой концентрации соли 200 мМ NaCl эта разница нивелировалась (рис. 2в). При помещении HRs в условия высоко-температурного стресса сырая масса корней контрольного варианта снизилась в 5, а трансгенных от 2.1 до 3.2 раза относительно стандартного. Сырая масса трансгенных линий при этом была больше контроля в среднем в 2.8 раза. В более жестких условиях гипертермии ( $35^{\circ}\text{C}$ ) сырая масса корней контроля достоверно уменьшилась в 45.5 раза, а трансгенных в 5.8–12.5 раза. Сырая масса трансгенных линий превышала контроль в среднем в 5.5 раза. На среде со 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$  сырая масса HRs так же достоверно уменьшалась, но у трансгенных линий все же была больше в среднем в 1.6 раза, чем у контроля. На среде со 100 мкМ CdAc также наблюдали значительное сокращение сырой массы контроля. При этом трансгенные линии по сырой массе превышали контроль в среднем в 3.7 раза.

Измерение сухой массы корней в стандартных условиях выявило менее значительные различия между трансгенными и контрольными HRs (рис. 2г). После культивирования в 150 мМ NaCl сухая масса была достоверно больше у линий L2–L4. При действии 200 мМ NaCl сухая масса некоторых трансгенных линий корней была даже меньше контроля. При гипертермии в  $32^{\circ}\text{C}$  сухая масса трансгенных линий была больше контроля в среднем в 2 раза, при  $35^{\circ}\text{C}$  – в 3.2 раза. Сухая масса корней в 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$  достоверно различалась от контроля в сторону повышения только в линиях L3 и L4. На среде со 100 мкМ CdAc сухая масса трансгенных корней была больше контроля в среднем в 2 раза (рис. 2г). Достоверность различий от контроля во всех случаях была доказана методом Duncan, все соответствующие числовые данные приведены в Дополнительных материалах (табл. 2–4).

*Конститутивная экспрессия гена AtGSTF11 позитивно влияет на состояние антиоксидантной системы при действии стрессовых факторов*

Так как трансгенные HRs обладали повышенной устойчивостью к действию стрессовых факторов, что может быть связано с обезвреживанием АФК и продуктов окисления, было решено изменить ряд параметров антиоксидантной системы.

При стандартных условиях активность СОД была достоверно выше у трансгенных линий. При засолении активность СОД в контроле возросла в 2.3 раза, тогда как у трансгенных линий осталась на том же уровне (рис. 3а). Активность пероксидаз в HRs (рис. 3б) резко возросла в условиях повышения температуры, причем в трансгенных корнях она была почти в 2 раза больше, чем в контроле. При действии остальных стрессовых факторов трансгенные и контрольные HRs существенно не отличались по активности пероксидаз. В стандартных условиях у трансгенных и контрольных HRs активность каталазы была на одном уровне (рис. 3в). При действии всех стрессовых факторов каталазная активность повышалась. К примеру, при засолении этот показатель во всех линиях достоверно повысился примерно в 2.8 раз, при гипертермии – в 1.7 раз и при действии кадмия – более чем в 3 раза. Достоверные отличия трансгенных линий в сторону уменьшения каталазной активности относительно контроля обнаруживались при засолении (рис. 3в). Интенсивность перекисного окисления липидов (рис. 3г) в культурах также увеличивалась при действии стрессоров. Причем в стандартных условиях содержание МДА у трансгенных линий было выше в среднем на 30%, чем в контроле. При засолении и тепловом стрессе HRs с трансгеном *AtGSTF11* отличались от контроля меньшим содержанием МДА. Содержание МДА в волосовидных корнях контрольных вариантов было максимально при гипертермии, превышая значения трансгенных культур примерно в 3 раза (рис. 3г). Скорость образования супероксид-аниона (рис. 3д) в HRs с трансгеном *AtGSTF11* по сравнению с контролем была выше почти в 4 раза при гипертермии и в 5 раз при действии CdAc. Содержание перекиси водорода (рис. 3е) было повышено во всех линиях волосовидных корней, которые подверглись действию стрессовых факторов. Стоит отметить, что в условиях гипертермии и повышенного содержания тяжелых металлов содержание перекиси в трансгенных корнях было достоверно меньше контроля. В стандартных условиях подобная закономерность не наблюдалась. В условиях гипертермии в контрольных вариантах содержание перекиси водорода увеличилось на 117% относительно стандарта, тогда как в линиях трансгенных корней только на 64% (рис. 3е). При действии стрессовых факторов накопление белка (рис. 3ж) уменьша-



**Рис. 3.** Анализ антиоксидантной системы культур HRs: (а) – СОД; (б) – пероксидазная активность; (в) – каталазная активность; (г) – МДА; (д) – скорость продукции супероксид-аниона; (е) – содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (ж) – содержание общего белка; (з) – общая антиоксидантная способность; (и) – содержание пролина. 1 – диккий тип, 2 – линия L1, 3 – линия L3. Звездочками (\*) обозначены достоверные различия от контроля согласно тесту Duncan ( $P < 0.05$ ).

лось во всех исследованных линиях HRs. Наименьшее количество растворимого белка было зафиксировано в культурах HRs, которые росли на среде с высоким содержанием ионов кадмия. Более высокое содержание белка у трансгенных линий HRs по сравнению с контролем было выявлено при засолении (рис. 3ж). ОАС всех линий HRs возросла на питательных средах с повышенным содержанием NaCl и на среде с ацетатом кадмия (рис. 3з). В условиях высоких температур мы наблюдали за снижением ОАС. Как при стандартных, так и при стрессовых условиях ОАС была достоверно выше в трансгенных HRs, по сравнению с контролем. Наибольшая разница между трансгенными и контрольными HRs по данному параметру была обнаружена при гипертермии (рис. 3з). Содержание пролина (рис. 3и) при стандартных условиях существенно не различалось между контролем и трансгенными линиями. Однако при действии стрессоров накопление пролина в контрольных HRs было выше. Так, при засолении в трансгенных HRs содержание пролина было ниже на 32–67%, чем в контроле (рис. 3и). Достоверность различий от контроля во всех случаях была доказана методом Duncan, все соответствующие числовые данные приведены в Дополнительных материалах (табл. 5–12).

#### *Конститутивная экспрессия гена AtGSTF11 повышает выживаемость культур HRs при их долговременном хранении*

Для опытов по долговременному хранению HRs использовали четыре схемы эксперимента, представленные в таблице 2. После долговременного хранения при низких положительных температурах все испытанные культуры HRs возобновляли рост даже после 240 дней хранения (рис. 4). При этом не наблюдалось заметных изменений в удельном приросте (рис. 5а) и выживаемость корней (рис. 5б) сохранялась на относительно высоком уровне ( $\geq 80\%$ ). Различие между трансгенными и контрольными линиями наблюдалось только при измерении удельного прироста, однако подобное же различие наблюдалось при стандартных условиях роста (рис. 1). Пережившие долговременное хранение HRs внешне ничем не отличались от обычных волосовидных корней. В условиях дефицита сахарозы нам удалось сохранить высокий уровень выживаемости контрольных HRs до 150 дней, после чего выживаемость резко падала. При этом некоторые линии трансгенных корней выживали даже после 210 дней хранения (рис. 5г), но пережившие более длительное хранение корни росли намного хуже, чем обычные HRs (рис. 5д).

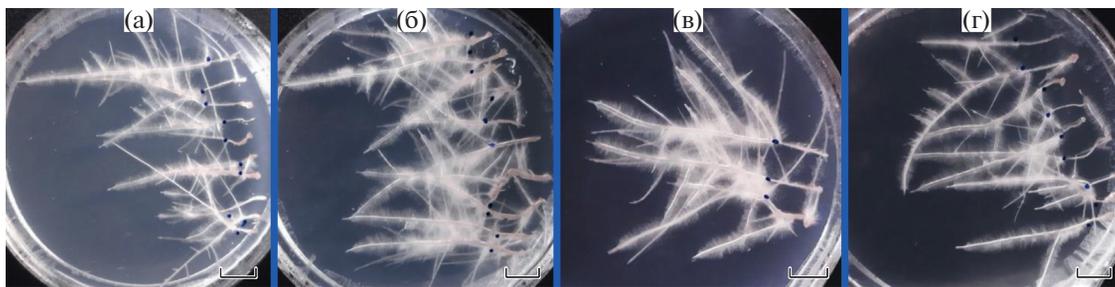


Рис. 4. Возобновление роста HRs на стандартной среде МС через 14 дней после долговременного хранения в течение 240 дней при температуре +3°C. (а) – дикий тип, (б) – линия L1, (в) – линия L2, (г) – линия L3. Масштаб 10 мм.

Большинство испытанных трансгенных линий дольше сохраняли способность к росту в сравнении с контролем. Удельный прирост корней при хранении их в 50 мМ маннитоле снижался (рис. 5е) уже на 60 день испытаний. Наиболее сильное снижение прироста наблюдалось в трансгенных линиях. Так в контроле прирост корней на 60 день сократился на 15%, тогда как в линиях L1 и L3 на 23 и 31% соответственно. Однако контрольные HRs удалось сохранить живыми только в течение 120 дней, тогда как отдельные линии трансгенных HRs выжили после 180 дней хранения на среде с маннитолом (рис. 5ж). Также были проведены эксперименты по хранению HRs при высоких концентрациях NaCl. После первых измерений (60–90 дней) мы зафиксировали небольшое увеличение удельного прироста корней (рис. 5з). При этом выживаемость корней (рис. 5и) постепенно падала, и в L2 уже на 90 день упала на 58%. Контрольные HRs прекратили рост после 150 дней хранения. В то же время трансгенные корни L3 выжили даже после 240 дней, при этом удельный прирост практически не отличался от изначального. Достоверность различий от контроля во всех случаях была доказана методом Duncan, все соответствующие числовые данные приведены в Дополнительных материалах (табл. 13–21).

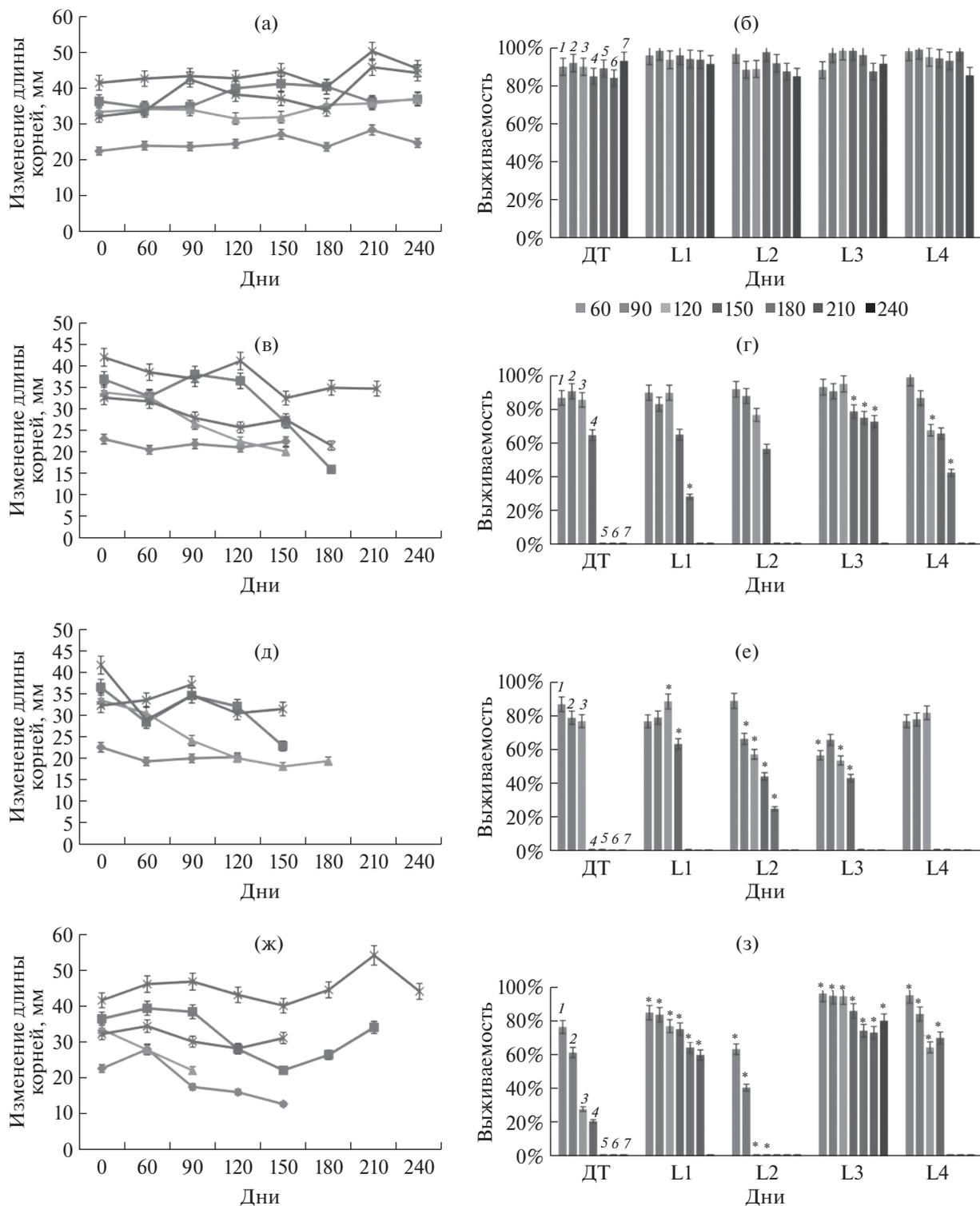
## ОБСУЖДЕНИЕ

HRs являются одной из перспективных систем в биотехнологии растений для наработки различных метаболитов и рекомбинантных белков, поэтому задача повышения их продуктивности весьма актуальна. Более того, при выращивании в промышленных масштабах HRs могут испытывать негативное воздействие из-за изменений условий, прежде всего состава среды и температуры культивирования. Поэтому создание стрессоустойчивых трансгенных HRs также является весьма актуальным. Мы выявили более высокие темпы роста трансгенных HRs *35S::AtGSTF11* по сравнению с контролем при нормальных условиях, действии NaCl, тяжелых металлов и теплового стресса (рис. 2). Вероятнее всего, такой позитивный эффект трансгена

*AtGSTF11* на рост HRs достигался за счет снижения негативного влияния оксидативного стресса.

В нормальных условиях трансгенные корни отличались от контроля повышением активности СОД и пероксидаз (рис. 3а, б), более высоким содержанием МДА (рис. 3г), высокой скоростью образования СА (рис. 3д) и более высокой общей антиоксидантной способностью (рис. 3з). Вероятно, трансгенные корни характеризовались более высокими темпами всех жизненных процессов, что сопровождалось более высоким уровнем окислительного стресса. Однако это не несло с собой существенных отрицательных эффектов, поскольку по показателям роста в длину и массе трансгенные линии превосходили контроль. Мы полагаем, что это обуславливалось как раз более высокими антиокислительными свойствами трансгенных волосовидных корней, что, в свою очередь, обеспечивалось как прямым действием экспрессии трансгена *AtGSTF11*, так, возможно, и опосредованным повышением активности пероксидаз за счет защитного действия глутатион-S-трансферазы. В целом, при действии стрессовых факторов в трансгенных HRs было зафиксировано более низкое содержание перекиси водорода и МДА, чем в контрольных HRs, что свидетельствует о более высоком антиоксидантном статусе трансгенных по гену *AtGSTF11* волосовидных корней, что приводило к уменьшению уровня перекисного окисления липидов.

При засолении было зафиксировано увеличение активности всех трех изученных нами ферментов антиоксидантной системы. Причем в трансгенных HRs определяющим оказалась каталаза, поскольку именно ее активность увеличилась в линиях L1 и L3 в 2.9 и 2.8 раза, соответственно. В контрольных HRs, в отличие от трансгенных форм, мы наблюдали повышение содержания пролина в ответ на действующие стрессоры. Повышенное содержание пролина при высоких концентрациях NaCl способствует стабилизации пероксидаз и каталаз [14], благодаря чему стрессоустойчивость тканей повышается. Также известно, что экзогенное внесение пролина способно усиливать активность пе-



**Рис. 5.** Изменения в длине корней и процент выживаемости HRs через 15 дней выращивания на среде МС после длительного хранения при температуре +3°C (а, б), дефиците сахарозы (в, г), 50 мМ маннитоле (д, е), 250 мМ NaCl (ж, з). ◆ — дикий тип, ■ — линия L1, ▲ — линия L2, ✕ — линия L3, ✱ — линия L4. 1 — 60 дней, 2 — 90 дней, 3 — 120 дней, 4 — 150 дней, 5 — 180 дней, 6 — 210 дней, 7 — 240 дней. Звездочками (\*) обозначены достоверные различия от контроля согласно тесту Duncan ( $P < 0.05$ ).

роксидаз и каталаз табака при засолении [19]. В трансгенных корнях при засолении мы наблюдали более низкие концентрации пролина, чем у контроля (рис. 4е). Вероятно, это связано с конститутивной экспрессией трансгена *AtGSTF11*, что говорит о возможном замещении одних компонентов антиоксидантной системы другими. То есть трансгенные волосовидные корни, вероятно, могут поддерживать высокий уровень стрессоустойчивости и без существенного повышения содержания пролина в условиях конститутивной экспрессии гена *AtGSTF11*. На это же указывает более высокий уровень ОАС у трансгенных HRs (рис. 4ж).

Выраженный эффект трансгена *AtGSTF11* был обнаружен в условиях гипертермии, где удельный прирост корней был достоверно выше контроля в среднем в 18 раз. Вероятно, такой эффект наблюдался из-за более быстрой активации ферментов антиоксидантной системы в ответ на повышение количества перекиси водорода (рис. 3е). Подобные же результаты были продемонстрированы на растениях табака в работе [20]. Положительный эффект *AtGSTF11* можно объяснить более быстрым восстановлением (а также устранением) окисленных фенольных соединений, на что указывает характер изменения ОАС (рис. 3з). Действительно, основной вклад в формирование общей антиоксидантной способности вносят витамины Е и С, каротиноиды, флавоноиды и производные коричной кислоты [21], а ОАС трансгенных HRs культур (рис. 3з) всегда была выше, чем в контроле. Стоит заметить, что при действии стрессоров активность каталаз так же возрастала (рис. 3в), но в условиях гипертермии она была значительно меньше. Вероятно, это связано с тем, что при высоких температурах окружающей среды перекись водорода, в основном, нейтрализуется с помощью пероксидаз [20]. В условиях гипертермии интенсивность перекисного окисления липидов в трансгенных культурах HRs возросла, однако не превосходила значения культур контрольных вариантов. Как уже было сказано, *AtGST* класса  $\rho$  способны нейтрализовать продукты перекисного окисления липидов [22]. Характер образования СА, как и содержание перекиси водорода в тканях, указывает на то, что перекисное окисление липидов происходит благодаря перекиси водорода (рис. 3е) и других АФК, но только не СА [23], поскольку продукция СА в HRs, где зарегистрировано повышенное содержание МДА, была значительно ниже стандартного и ниже, чем у трансгенных HRs, культивируемых в тех же условиях. С одной стороны, скорость образования СА в клетках часто коррелирует с интенсивностью внутренних биохимических процессов [24] и можно говорить о том, что в более продуктивных тканях СА образуется с большей интенсивностью [15]. С другой стороны, скорость образования СА может

указывать на степень повреждения энергетических систем и степень ингибирования электрон-транспортной цепи продуктами кислородного окисления [15, 24]. Несмотря на то, что супероксид-анион может напрямую ингибировать или модифицировать некоторые белки, его токсичность связана, главным образом, с образованием высокореактивного гидроксильного радикала [15]. А поскольку активность СОД (рис. 4а) не сильно менялась в присутствии CdAc, то можно предположить, что СА своевременно дисмутировал в перекись водорода [24, 25].

При действии ацетата кадмия активность СОД понижалась (рис. 3а), а показатели активности каталаз повышались (рис. 3в), тогда как активность пероксидаз (рис. 3б) практически не изменилась. Ранее другими авторами были получены как схожие с нашими данные [25], так и немного отличающиеся [26]. Вероятнее всего, это связано с использованной в работах концентрацией ионов тяжелого металла. При низких концентрациях активность ферментов повышается, компенсируя токсическое действие ацетата кадмия, при более высоких – ферменты повреждаются и их активность падает. Накопление МДА в трансгенных HRs при действии CdAc увеличилось в 2.1 раза (рис. 3г), содержание перекиси водорода в среднем возросло в 1.4 раза (рис. 3е) относительно значений стандарта. В то же время в контрольных HRs содержание МДА выросло в 4.6 раза, а перекиси водорода – в 2 раза. Несмотря на более высокое, чем в стандартных условиях, содержание перекиси водорода и МДА в культурах контрольных HRs, скорость выработки СА была ниже относительно стандартного на 78%. Эти данные согласуются с тем, что кадмий оказывает общее токсическое действие, нарушает процессы экспрессии генов, снижает скорость транспорта веществ через мембрану [27]. При действии кадмия скорость образования СА в трансгенных корнях падала на 14–28%. Возможно, в трансгенных растениях продукт гена *AtGSTF11* ускорял процесс связывания кадмия с глутатионом [28], вследствие чего степень негативного действия кадмия уменьшалась.

Таким образом, конститутивная экспрессия гена *AtGSTF11* уменьшала содержание  $H_2O_2$ , повышала активность ферментов антиоксидантной системы и, как итог, существенно уменьшала интенсивность перекисного окисления липидов при действии стрессоров.

Нам удалось сохранить живыми культуры HRs табака в течение 240 дней (8 месяцев) при низких положительных температурах (рис. 5а, б). Ранее сообщалось об успешном сохранении культуры HRs *P. ginseng* в течение четырех месяцев при 4°C [12]. При этом выживаемость составляла 100%, в то время как при криогенном хранении выживаемость составляла менее 14% [29]. Уменьшение

количества сахарозы в среде показывала хорошие результаты в работах Nagatome с соавт. [11]. Им удалось сохранить культуры корней *N. tabacum* в течение 600 дней при концентрации сахарозы в 2 г/л. Однако нам не удалось повторить эти результаты, испытанные HRs погибли после 200 дней хранения. А вот возможность долговременного хранения культур HRs на среде с маннитолом и при высокой концентрации NaCl, по-видимому, не изучалась ранее. Под действием этих стрессоров исследованные нами HRs табака оставались живыми, однако их не следует хранить в таких условиях дольше 90 дней (рис. 5).

Внедрение гена *AtGSTF11* в культуру HRs действительно помогло повысить выживаемость культур после долговременного хранения без криогенной заморозки. К примеру, при дефиците сахарозы в питательной среде трансгенные линии HRs сохраняли способность к росту на 90 дней дольше, в маннитоле на 60 дней дольше, чем контрольные волосовидные корни без трансгена *AtGSTF11*. При условиях засоления одна линия трансгенных HRs выживала даже после 240 дней долговременного хранения, что говорит о существенном положительном эффекте трансгена.

Итак, ген *AtGSTF11* и его ортологи являются потенциальной мишенью в геномной инженерии и геномном редактировании растений для целенаправленного изменения продуктивности и стрессоустойчивости не только трансгенных растений, но и культур волосовидных корней. В нашей работе трансген *AtGSTF11* повышал устойчивость HRs в условиях засоления, гипертермии и загрязнения тяжелыми металлами. Эти положительные эффекты объясняются комплексным действием продукта гена *AtGSTF11* на антиоксидантную систему, в результате которой повышалась скорость восстановления клеточных антиоксидантов, снижалась интенсивность перекисного окисления мембранных липидов. Повышенная экспрессия гена *AtGSTF11* также может быть полезна при долговременном хранении HRs, сохраняя их жизнеспособность на более длительный срок.

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А19-119021190011-0 при поддержке гранта Президента Российской Федерации МД-2304.2020.4.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dixon D.P., Laphorn A., Edwards R. Plant glutathione transferases // *Genome Biology*. 2002. V. 3. P. 3004.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-3-reviews3004>
2. Islam S., Rahman I.A., Islam T., Ghosh A. Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles // *PLoS One*. 2017. V. 2: e0187504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187504>
3. Tossounian M.A., Wahni K., Van Molle I. Redox-regulated methionine oxidation of *Arabidopsis thaliana* glutathione transferase Phi9 induces H-site flexibility // *Protein Science: a Publication of the Protein Society*. 2019. V. 28. P. 56. <https://doi.org/10.1002/pro.3440>
4. Freeman J.L., Michael W., Persans K., Albrecht C., Peer W., Pickering I.J., Salt D.E. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi nickel hyperaccumulators* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 2176.
5. Gallé A., Czékus Z., Bela K., Horváth E., Ördög A., Csiszár J., Poór P. Plant glutathione transferases and light // *Front. Plant Sci*. 2019. V. 9. P. 1944. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01944>
6. Nianiou-Obeidat I., Madesis P., Kissoudis C. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications // *Plant Cell Rep*. 2017. V. 36. P. 791. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2139-7>
7. Doran P.M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations // *Biotechnol. Bioeng*. 2009. № 103. P. 60. <https://doi.org/10.1002/bit.22280>
8. Sosa A.L.G., Agostini E., Medina M.I. Antioxidant response of tobacco (*Nicotiana tabacum*) hairy roots after phenol treatment // *Plant Physiol. Biochem*. 2011. V. 49. P. 1020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.009>
9. Wang L., Chen Q., Xin D., Qi Z., Zhang C., Li S., Jin Y., Li M., Mei H., Su A., Wu X. Overexpression of *Gm-BIN2*, a soybean glycogen synthase kinase 3 gene, enhances tolerance to salt and drought in transgenic *Arabidopsis* and soybean hairy roots // *J. Integr. Agric*. 2018. V. 17. P. 1959.
10. Benson E.E., Hamill J.D. Cryopreservation and post freeze molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* // *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 1991. V. 24. P. 163. <https://doi.org/10.1007/BF0003347>
11. Nagatome H., Yamamoto T., Taya M., Tanaka N. Viability of plant hairy roots is sustained without propagation in low sugar medium kept at ambient temperature // *Biochem. Eng. J*. 2000. V. 6. P. 75. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00077-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00077-2)
12. Yoshimatsu K., Yamaguchi H., Shimomura K. Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryopreservation // *Plant Cell Rep*. 1996. V. 15. P. 555. <https://doi.org/10.1007/BF00232452>
13. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонова Н.А., Румянцева Н.И. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие / Под ред. Г.В. Сибгатуллиной, Л.Р. Хаертдиновой, Е.А. Гумеровой, А.Н. Акулова, Ю.А. Костюковой, Н.А. Никоновой, Н.И. Румянцевой. Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет. 2011. 61 с.
14. 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>
15. Minibayeva F.V., Kolesnikov O.P., Gordon L.K. Contribution of a plasma membrane redox system to the superoxide production by wheat root cells // Protoplasma. 1998. V. 205. P. 101.  
<https://doi.org/10.1007/BF01279299>
  16. Chaouch S., Queval G., Vanderauwera S., Mhamdi A., Vandenabeele M., Langlois-Meurinne M., Breusegem F., Saindrenan P., Noctor G. Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE1 in a daylength-related manner // Plant Physiol. 2010. V. 153 P. 1692.  
<https://doi.org/10.1104/pp.110.153957>
  17. 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 Ca<sup>2+</sup> // New Phytol. 2001. V. 151. P. 185.  
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x>
  18. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., Seal C.E., Wade E.M., Muscolo A., Papenbrock J. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation // AoB Plants. 2014. V. 13. P. 6.  
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plu046>
  19. Hoque M.A., Okuma E., Banu M.N. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities // J. Plant Physiol. 2007. V. 164. P. 553.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.03.010>
  20. Van Rensburg L., Krüger G. H. J. Evaluation of components of oxidative stress metabolism for use in selection of drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L // J. Plant Physiol. 1994. V. 143. P. 730.
  21. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E // Anal Biochem. 1999. V. 269. P. 337.
  22. Nianiou-Obeidat I., Madesis P., Kissoudis C. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications // Plant Cell Reports. 2017. V. 36. P. 791.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-017-2139-7>
  23. Hammond-Kosack K.E., Jones J.D. Resistance gene-dependent plant defense responses // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1773.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1773>
  24. Brand M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production // Exp Gerontol. 2010. V. 45. P. 466.  
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
  25. Hui F., Liu J., Gao Q., Lou B. *Piriformospora indica* confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum* // J. Environ. Sci.-China. 2015. V. 37. P. 184.  
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.06.005>
  26. Bominathan R., Doran P.M. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* // Biotechnol. Bioeng. 2003. V. 2. P. 158.  
<https://doi.org/10.1002/bit.10656>
  27. Bove L., Rossi L., Lugon-Moulin N. Cadmium partitioning and gene expression studies in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica* // Physiol. Plant. 2009. V. 128. P. 466.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00756.x>
  28. Csiszár J., Horváth E., Bela K., Gallé Á. Glutathione-related enzyme system: glutathione reductase (GR), glutathione transferases (GSTs) and glutathione peroxidases (GPXs) // Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses. Springer, Cham, 2016. P. 137.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-44081-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44081-1_7)
  29. Oh S.Y., Wu C.H., Popova E. Cryopreservation of *Panax ginseng* adventitious roots // J. Plant Biol. 2009. V. 52. P. 348.  
<https://doi.org/10.1007/s12374-009-9045-7>

УДК 581.1

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse – ПРОДУЦЕНТА ИЗОФЛАВОНОИДОВ

© 2021 г. М. В. Титова<sup>a, \*</sup>, Д. В. Кочкин<sup>a, b</sup>, А. А. Фоменков<sup>a</sup>, И. М. Иванов<sup>a</sup>, Е. А. Котенкова<sup>c</sup>,  
Г. Л. Кочарян<sup>d</sup>, Э. Г. Дживишев<sup>e</sup>, Н. П. Мехтиева<sup>e</sup>, Е. В. Попова<sup>a</sup>, А. М. Носов<sup>a, b</sup>

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

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

<sup>c</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр пищевых систем  
им. В.М. Горбатова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>d</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

<sup>e</sup>Институт ботаники Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

\*e-mail: titomirez@mail.ru

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

Впервые получена суспензионная культура клеток верблюжьей колючки *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse и исследованы ее ростовые характеристики при выращивании в различных системах (колбы и барботажные биореакторы с рабочим объемом 15 л). Показано, что полученная культура характеризуется достаточно интенсивным ростом (накопление сухой биомассы – 15–20 г/л, индекс роста – 11–16, удельная скорость роста –  $0.15 \pm 0.01$  сут<sup>-1</sup>), при этом ростовые характеристики при выращивании исследуемой культуры в биореакторах незначительно отличались от таковых при выращивании в колбах. Проведено предварительное изучение качественного состава вторичных метаболитов в биомассе данной культуры клеток, выращенной в колбах, с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (УЭЖХ ЭР МС). Показано наличие изофлавонов различных структурных групп: свободные изофлавоны (изомер афрормозина), глюкозиды изофлавонов (глюкозиды каликозина и формонетина) и ацилированные глюкозиды изофлавонов (малонил-глюкозиды каликозина, формонетина, генистина и изомера афрормозина). Экстракты из биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum*, выращенной в колбах, были протестированы на антимикробную активность. В качестве тест-культур использовали культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Было показано, что экстракты проявляли специфическую антимикробную активность по отношению к *S. aureus*, однако не проявляли ее по отношению к *P. aeruginosa*. Таким образом, полученная культура клеток *A. persarum* является перспективным объектом для дальнейшего изучения и потенциального использования в качестве альтернативного источника растительного сырья и характерных для данного вида биологически активных соединений.

**Ключевые слова:** культура клеток *in vitro*, суспензионная культура клеток, изофлавоны, антимикробная активность, эндемичные и редкие виды растений, *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse

**DOI:** 10.31857/S0015330321040205

### ВВЕДЕНИЕ

Различные виды верблюжьей колючки *Alhagi* spp. традиционно используются в восточной народной медицине в составе лекарственных средств для лечения ревматизма, бронхита, астмы, гастроэнтерита и язвы, заболеваний печени, мочевыводящих путей и желчного пузыря [1–4]. Недавние *in vivo* и *in vitro* исследования биологической активности растений рода *Alhagi* spp. выявили антибактери-

альный, противогрибковый, антиоксидантный, антипролиферативный и спазмолитический эффекты [5–8]. Известно применение экстрактов *Alhagi* spp. как косметических ингредиентов при лечении гиперпигментации кожи. Кроме того, растения рода *Alhagi* spp. представляют особый интерес как потенциальный компонент функциональных продуктов питания и кормов благодаря высокому содержанию легко перевариваемого

белка в сочетании с другими эссенциальными питательными элементами и минералами [9, 10]. Из различных органов растений *Alhagi* spp. были выделены и идентифицированы вторичные метаболиты, относящиеся к различным классам природных соединений, а именно: фенольные соединения (фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, проантоцианидины, ксантоны, кумарины, гидролизуемые танины, дифениловые эфиры и нафтохиноны), алкалоиды (арилэтиламины, производные пиррола, изохинолиновые алкалоиды), тритерпеновые соединения, сахара, витамины С, К и группы В и некоторые другие [11]. Таким образом, растения данного рода представляют собой интересный объект как для изучения биосинтеза биологически активных вторичных метаболитов, так и для более широкого использования в фармакологии и ветеринарии.

В качестве объекта исследования использовали эндемика Средней Азии верблюжью колючку персидскую, *A. persarum* Boiss. et Buhse (принятое название *Alhagi maurorum* Medik.), известную своими лекарственными свойствами и высоким содержанием биологически активных веществ, в том числе флавоноидов [11]. В настоящей работе исследовали возможность получения суспензионной культуры клеток *A. persarum* в качестве альтернативного источника растительного сырья и характерных для этого вида биологически активных веществ.

Считается, что культивируемые *in vitro* клетки высших растений обладают рядом преимуществ при использовании как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях в области физиологии и биохимии растений, цитологии, биоинженерии [12]. Однако публикаций по получению и изучению культур клеток и тканей *Alhagi* spp. сравнительно немного. Определенную сложность при анализе публикаций, посвященных верблюжьей колючке, представляет высокая степень ее полиморфизма, и как следствие – различие в определении ее видовой принадлежности. Известен ряд синонимов для вида *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse, включая *A. camelorum* Fisch.; *A. pseudalhagi* (M. Bieb.) Fisch.; *A. pseudalhagi* subsp. *persarum* (Boiss. et Buhse) Takht.; *Hedysarum alhagi* L.; *H. pseudalhagi* M. Bieb.; *A. maurorum* Medik. subsp. *maurorum*; *A. camelorum* var. *spinis-elongatis* Boiss. Различия видовой принадлежности обусловлены наблюдаемыми различиями по высоте, размеру плодов и характеру ветвления побегов в зависимости от состава почвы и климатических условий произрастания.

Согласно литературным данным, впервые культура тканей верблюжьей колючки с высокой регенеративной способностью была получена Bharal и Rashid для *A. camelorum* [13]. Позже был выполнен ряд работ по микрклональному размножению, получению каллусных культур клеток, культур

“бородатых” корней и регенерантов для других видов, в частности *A. graecorum* [14]. В литературе, однако, практически отсутствуют данные о подробном изучении соединений вторичного метаболизма в культурах тканей и органов *Alhagi* spp. *in vitro*. В части публикаций представлены данные только по общему содержанию белков, фенольных соединений, липидов и аминокислот [14, 15].

Целью данной работы являлось получение суспензионной культуры клеток верблюжьей колючки персидской, *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse, изучение ее ростовых характеристик при выращивании в различных системах (колбах и биореакторах), а также изучение содержания биологически активных веществ и оценка антимикробной активности экстрактов полученной клеточной биомассы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение и выращивание суспензионной культуры клеток.** Суспензионная культура клеток *A. persarum* Boiss. et Buhse (синоним *Alhagi maurorum* Medik.) была получена из каллусной линии Ap1-207, иницированной из гипокотила стерильных проростков *in vitro* этого вида [16].

Получение и выращивание суспензионной культуры клеток проводили на среде с минеральной основой по В5 [17] с добавлением сахарозы,  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 6-бензиламинопурина. Культивирование в колбах осуществляли в климатической камере на орбитальном шейкере в темноте при температуре 26–27°C, влажности 70–75% и скорости вращения 95–100 об/мин. Используемые в работе колбы и инструменты стерилизовали в течение 60 мин при 180°C в сухожаровом шкафу.

Для аппаратного выращивания использовали барботажный соплоконусный ферментер (разработка Отдела биологии клетки и биотехнологии РАН; точечное аэрирующее устройство; общий объем – 20 л; рабочий объем – 15 л). Выбор типа биореактора был основан на проведенных ранее работах, в которых было показано, что наименьшее стрессовое воздействие на клетки оказывают барботажные ферментеры V-типа, в которых перемешивание суспензии осуществляется за счет потока стерильного воздуха, подаваемого в аппарат под давлением [18, 19]. Концентрацию растворенного кислорода (pO<sub>2</sub>) поддерживали на уровне 10–40% от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования. Для уменьшения отрицательного воздействия перемешивания на начальных фазах роста устанавливали минимальную скорость потока воздуха по отсутствию седиментации клеток. В период экспоненциального роста скорость увеличивали до максимально возможной, не приводящей к разрушению клеток (степень поврежде-

ния определяли микроскопически). Температуру суспензии в аппарате поддерживали на уровне 26–27°C.

Цикл субкультивирования для суспензионной культуры в колбах и в биореакторе составлял 14 сут.

**Определение ростовых характеристик суспензионной культуры клеток.** Характеристику полученной суспензионной культуры клеток проводили путем измерения в процессе культивирования следующих основных параметров: содержание сухой и сырой биомассы, жизнеспособность культуры [20].

Для определения содержания сырой биомассы в литре среды, фиксированный объем суспензии (не меньше 15 мл) фильтровали через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера под вакуумом, промывали дистиллированной водой и взвешивали. Для определения содержания сухой биомассы, биомассу высушивали до постоянного веса в токе воздуха с температурой 40–50°C. Показатели снимали в течение как минимум 20 сут с интервалом 2–3 сут. Для каждой временной точки использовали три повторности (три колбы или три пробы, отобранные из биореактора,  $n = 3$ ).

Жизнеспособность культур клеток определяли, используя прижизненный краситель феносафранин (0.1% раствор) либо 0.025% синьку Эванса, путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом. Для каждой временной точки определение проводили в трех образцах, подсчитывая не менее 200 клеточных агрегатов в каждом образце.

По полученным результатам рассчитывали индекс роста ( $I$ ) и удельную скорость роста в экспоненциальной фазе ( $\mu$ ) по следующим формулам:

$$I = (X_{\max} - X_0) / X_0, \quad (1)$$

где  $X_{\max}$  – максимальное содержание сухой биомассы в литре среды;

$X_0$  – начальное содержание сухой биомассы в литре среды;

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1), \quad (2)$$

где  $X_2$  – содержание сухой биомассы в литре среды в момент времени  $t_2$ ;

$X_1$  – содержание сухой биомассы в литре среды в момент времени  $t_1$ .

**Фитохимический анализ биомассы суспензионной культуры клеток.** Для качественного анализа вторичных метаболитов в биомассе суспензионной культуры клеток *A. persarum* использовали ультраэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (УЭЖХ ЭР МС).

УЭЖХ ЭР МС анализ проводили на хроматографе Waters Acquity UPLC (Waters, США), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters, США).

Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов (диапазон  $m/z$  100–2000). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 120°C, температура десольвации – 250°C, напряжение на капилляре – 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) – 600 л/ч.

Условия хроматографического разделения: колонка ACQUITY UPLC VEN Phenyl (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм; Waters, Ирландия), температура колонки – 40°C, скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. Компоненты подвижной фазы: 0.1% (v/v) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (v/v) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). При выполнении всех анализов использовали градиентный режим элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (растворитель Б, v/v): 0–1 мин – 15%, 1–5 мин – 15 → 30%, 5–15 мин – 30 → 38%, 15–15.5 мин – 38 → 45%, 15.5–23 мин – 45%, 23–23.5 мин – 45 → 95%.

Навеску измельченного растительного материала (70 мг) экстрагировали 3 раза в 1 мл 70% (v/v) водного этилового спирта в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ-12, Сапфир, Россия), после чего центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин (Микроцентрифуга МЦФ, Россия) и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом (при температуре 40°C). Полученный экстракт суспендировали в 1 мл 5% (v/v) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде и наносили на патрон для твердофазной экстракции (ТФЭ) Supelclean ENVI-18 (Supelco, США). Патрон промывали 3 мл 5% (v/v) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде, аналиты смывали 3 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом при 40°C. Перед анализом экстракты растворяли в 1 мл смеси ацетонитрила и воды (1 : 1, v/v). Объем инъекции – 1 мкл.

**Исследование антимикробной активности экстрактов из клеточной биомассы полученных суспензионных культур клеток.** Для работ по первичному скринингу антимикробной активности использовали образцы сухой клеточной биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum*, выращиваемой в колбах. Образцы биомассы отбирали на 14 сут культивирования и высушивали до постоянного веса в токе воздуха при температуре 40–50°C.

Для получения экстракта в пробирку типа Фалькон помещали навеску 400–600 мг сухой массы клеток и добавляли 7 мл 70% этилового спирта. Экстрагировали в ультразвуковой ванне (УЗВ-12, Сапфир, Россия; рабочая частота – 35 кГц) в течение 30 мин при комнатной температуре. Центрифугировали в течение 15 мин при 2700 об/мин

на центрифуге ЦЛМН-Р10-01 “Элекон” (Россия). Упаренный остаток лиофильно высушивали, затем разводили дистиллированной водой до 2% прозрачного раствора.

Культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 выращивали на скошенном Триптиказо-соевом агаре (TSA, Liofilchem, США) при 37°C в течение 24 ч, смывали физиологическим раствором, доводя до концентрации  $1 \times 10^9$  по стандарту мутности МакФарланда. Полученную суспензию объемом 100 мкл переносили в пробирки типа Эппендорф с 2 мл Триптиказо-соевого бульона (TSB, Liofilchem, США). Для культивирования *S. aureus* в TSB бульон добавляли 0.1% Tween 80 (Liofilchem, США). Пробирки с культурой инкубировали на термошейкере TS-10 (BioSan, Латвия) при температуре 37°C в течение 4 ч. Концентрацию выращенной биомассы в бульоне измеряли с помощью фотометра OD600 (Implen, Германия) и сравнивали с калибровочной кривой для определения концентрации клеток в бульоне. В качестве положительного контроля использовали суспензию в концентрации около  $3 \times 10^7$  КОЕ/мл. Для получения отрицательного контроля полученную суспензию прогревали при 100°C в течение 10 мин. Для получения суспензии смешанных клеток, состоящей из 50% живых и 50% предположительно нежизнеспособных клеток, смешивали в одинаковых долях живые и мертвые клетки соответственно.

Для определения антимикробной активности объектов исследования методом проточной цитометрии по отношению к *S. aureus* и *P. aeruginosa*, 10, 20 или 30 мкл приготовленного образца экстракта смешивали соответственно с 90, 80 или 70 мкл культуры с начальной концентрацией клеток  $2.0 \times 10^7$  кл/мл для *S. aureus* и  $2.8 \times 10^7$  кл/мл для *P. aeruginosa* и тщательно перемешивали пипетированием. Для положительного контроля вместо экстрактов биомассы добавляли соответственно 10, 20 или 30 мкл Триптиказо-соевого бульона (TSB, Liofilchem, США). Образцы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 3.5 и 20 ч.

Протокол анализа по истечении 3.5 часов инкубирования образцов в термостате с использованием набора реагентов LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (Thermo Fisher Scientific, США) был следующим: 987 мкл 0.9% раствора натрия хлорида смешивали с 1.5 мкл готового раствора SYTO 9 и 1.5 мкл готового раствора PI, тщательно перемешивали, добавляли 10 мкл культуры, тщательно перемешивали, инкубировали в темных светозащитных эппендорфах (Axigen, США) в течение 15 мин, измеряли популяции живых и мертвых клеток на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore, США).

Протокол анализа по истечении 20 ч инкубирования образцов в термостате с использованием набора реагентов LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (Thermo Fisher Scientific, США) был следующим: 992 мкл 0.9% раствора натрия хлорида смешивали с 1.5 мкл готового раствора SYTO 9 и 1.5 мкл готового раствора PI, тщательно перемешивали, добавляли 5 мкл культуры, тщательно перемешивали, инкубировали в темных светозащитных эппендорфах (Axigen, США) в течение 15 мин, измеряли популяции живых и мертвых клеток на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore, США).

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам. На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения из 3 биологических повторностей (по 3 колбы или по 3 фиксированных объема биологического материала на точку) для каждого срока, пассажа и варианта культивирования. Стандартные отклонения менее 10% от величин средних значений на графиках не отображали. Бары на диаграммах соответствуют максимальным величинам доверительных интервалов при 95%-м уровне вероятности по *t*-критерию Стьюдента.

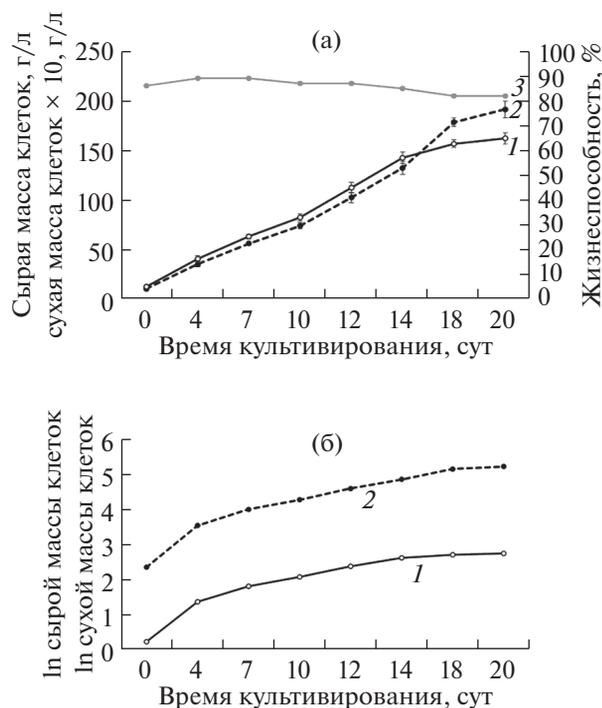
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Получение суспензионной культуры клеток*

Для получения клеточной суспензии 300–400 мг каллусной культуры помещали в колбы объемом 0.25 л с 25 мл жидкой питательной среды и культивировали на орбитальном шейкере при 95–100 об/мин. Через 18–20 сут культивирования осуществляли пересев надосадочной фракции клеток, постепенно увеличивая степень разбавления от 1 : 2 до 1 : 8 (соотношение объема инокулята к объему свежей питательной среды) и сокращая цикл субкультивирования. В процессе получения суспензионной культуры клеток наблюдали интенсивное образование мелкой надосадочной фракции и быструю адаптацию культуры к новым условиям выращивания. Спустя 3 мес. с момента получения первичной клеточной суспензии (5 циклов субкультивирования), длина цикла субкультивирования составляла 14 сут при начальной плотности посадки 0.8–1.0 г/л по сухой массе клеток.

### *Динамика роста суспензионной культуры клеток при выращивании в колбах*

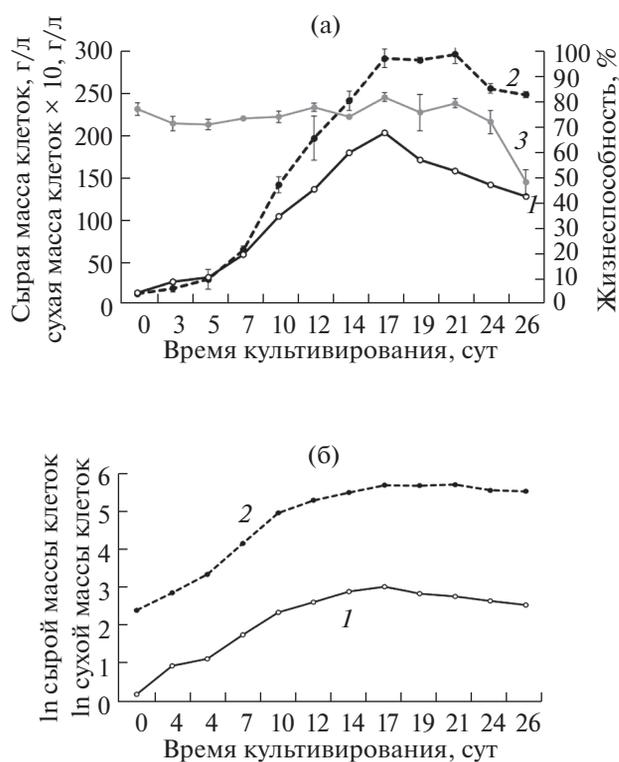
Изучение ростовых показателей полученной суспензионной культуры клеток проводили при стандартном периодическом выращивании в колбах на качалке на 8 цикл субкультивирования после получения. Для подтверждения стабильности полученных результатов определение основных ро-



**Рис. 1.** Динамика роста суспензионной культуры клеток *A. persarum* при выращивании в колбах объемом 250 мл (8 цикл субкультивирования): а – линейная система координат; б – полулогарифмическая система координат. 1 – сухая масса клеток; 2 – сырая масса клеток; 3 – жизнеспособность.

стовых характеристик повторяли через полгода (22 цикл субкультивирования). На основе полученных данных были построены кривые роста по сырой и сухой массе и жизнеспособности в нормальной и полулогарифмической системах координат (рис. 1, 2). Рассчитанные по полученным данным основные ростовые показатели представлены в табл. 1.

Исследуемая суспензионная культура клеток по степени агрегированности характеризовалась высоким уровнем гетерогенности, более 60% приходилось на агрегаты размером более 50 клеток. В течение первых 3 мес. субкультивирования также встречались очень крупные жизнеспособ-



**Рис. 2.** Динамика роста суспензионной культуры клеток *A. persarum* при выращивании в колбах объемом 250 мл (22 цикл субкультивирования): а – линейная система координат; б – полулогарифмическая система координат. 1 – сухая масса клеток; 2 – сырая масса клеток; 3 – жизнеспособность.

ные агрегаты диаметром 2.5–5.0 мм. Количество жизнеспособных единичных клеток и мелких агрегатов (до 5 клеток) было незначительно. Агрегаты были представлены двумя типами клеток – меристематическими и паренхимоподобными. Причем число последних увеличивалось к концу стационарной фазы цикла субкультивирования во всех вариантах. Форма агрегатов была преимущественно округлая.

Для исследуемой культуры (при контрольной начальной плотности посадки около 0.9–1.2 г/л по сухой биомассе клеток) цикл субкультивиро-

**Таблица 1.** Ростные показатели суспензионной культуры клеток *A. persarum* при выращивании в различных системах

Культура		$M_{\max\_dw}$ , г/л	$v$ , %	$\mu_{dw}$ , сут <sup>-1</sup>	$I_{dw}$
Колбы	8 цикл субкультивирования	15.25 ± 1.53	87.5 ± 4.22	0.15 ± 0.01	11.38 ± 0.40
	22 цикл субкультивирования	20.05 ± 2.12	75.1 ± 2.03	0.15 ± 0.01	15.85 ± 0.87
Биореакторы		13.71 ± 1.84	74.1 ± 2.16	0.12 ± 0.01	8.72 ± 0.72

Примечание:  $M_{\max\_dw}$  – максимальное значение накопления биомассы клеток по сухому весу;  $v$  – жизнеспособность клеток;  $\mu$  – удельная скорость роста;  $I$  – индекс роста.

вания при определении ростовых характеристик составлял 20 и 26 сут на 8 и 22 циклы субкультивирования соответственно. Продолжительность лаг-фазы роста находилась в пределах 1–2 и 4–5 сут соответственно, фаза экспоненциального роста составила 9–10 сут для обоих вариантов. Стационарная фаза наступала на 14–16-е сут, фазу деградации удалось зафиксировать только для 22 цикла субкультивирования, начиная с 17 сут.

Следует отметить изменение характера ростовой кривой и некоторое повышение ростовых характеристик за 14 циклов выращивания культуры, в частности, увеличение на 20–25% индекса роста и уровня накопления биомассы клеток. Кроме того, к 22 циклу культивирования в культуре практически исчезли крупные агрегаты с диаметром 3 мм и более.

#### Аппаратное культивирование суспензионной культуры клеток в периодическом режиме

С целью определения возможности аппаратного выращивания полученной суспензионной культуры клеток, было проведено периодическое культивирование в лабораторном барботажном биореакторе с рабочим объемом 15 л. Ростовые характеристики культуры при выращивании в биореакторах представлены в табл. 1 и на рис. 3.

Из полученных результатов следует, что общий характер роста исследуемой культуры клеток в аппарате данного типа при периодическом режиме был в целом сходен с характером ее роста в колбах. К концу цикла субкультивирования (на 16 сут) наблюдали некоторое снижение жизнеспособности клеток (в среднем до 74%), степени агрегированности и уровня максимального накопления клеточной биомассы (13.71 г/л по сухой массе клеток).

#### Изучение качественного состава вторичных метаболитов в полученной культуре клеток

С помощью УЭЖХ ЭР МС был проведен физикохимический анализ биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum*. УЭЖХ ЭР МС проводили в режиме детектирования положительно-заряженных ионов, поскольку в этом режиме при электрораспылительной ионизации для многих природных соединений часто наблюдается фрагментация (с образованием характеристических осколочных ионов) уже в источнике ионизации [21]. Это позволяет проводить достаточно быструю структурную идентификацию метаболитов при ограниченном числе хроматографических разделений. Структурную идентификацию соединений проводили на основании расшифровки результатов масс-спектрометрии (фрагментации протонированных молекул в источнике ионизации), анализа относительного хроматографического

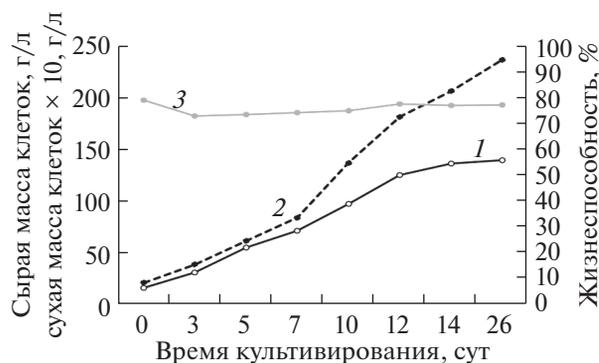


Рис. 3. Динамика роста суспензионной культуры клеток *A. persarum* при выращивании в 20 л барботажном биореакторе (линейная система координат). 1 — сухая масса клеток; 2 — сырая масса клеток; 3 — жизнеспособность.

поведения соединений и сопоставления этих результатов с данными литературы [22–24].

Результаты УЭЖХ ЭР МС идентификации вторичных метаболитов в экстракте из биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum*, выращенной в колбах (12 сут культивирования, конец экспоненциальной фазы роста, начало стационарной фазы), представлены в табл. 2. Установлено, что в биомассе данной культуры клеток присутствуют изофлавоны нескольких структурных типов: свободные изофлавоны (изомер метилированного изофлавона афрормозина), глюкозиды изофлавонов (глюкозиды каликозина и формонетина) и ацилированные (малонилированные) глюкозиды изофлавонов (малонил-глюкозиды каликозина, формонетина, генистеина и изомера афрормозина).

#### Исследование антимикробной активности экстрактов из клеточной биомассы полученных суспензионных культур клеток

Для проведения анализа на антимикробную активность комплексных экстрактов биомассы культур клеток *A. persarum* использовали проточную цитометрию. К культурам клеток патогенов *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 добавляли экстракты *A. persarum* и инкубировали 3.5 и 20 ч. После соответствующей обработки (см. выше описание методики), измеряли популяции живых и мертвых клеток на проточном цитометре.

Результаты исследования антимикробной активности образцов экстрактов по отношению к *S. aureus* и *P. aeruginosa* после 3.5 ч инкубирования приведены соответственно в табл. 3 и 4. Ингибирующий эффект по отношению к *S. aureus* наблюдали уже при добавлении 10 мкл экстракта, при этом эффект усиливался с повышением дозы экстракта

**Таблица 2.** Результаты УЭЖХ ЭР МС анализа (регистрация положительных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum* (линия Ap1-207sus, 12 сут выращивания в колбах)

$t_R$ , мин*	Масс-спектры, $m/z$ **			Результаты идентификации
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[Агликон+H] <sup>+</sup>	
2.04	447.1	469.1	285.1	Каликозин-7-О-Glc
2.81	533.1	555.1	285.1	Каликозин-7-О-Glc-О-Mal
3.32	431.1	453.1	269.1	Формононетин-7-О-Glc
3.54	549.1	571.1	301.1	Изомер диметоксиптерокарпана-3-О-Glc-О-Mal
4.19	517.1	539.1	269.1	Формононетин-7-О-Glc-О-Mal
4.68	547.1	569.1	299.1	Изомер афрормозина-7-О-Glc-О-Mal
5.03	519.1	541.1	271.1	Генистеин-7-О-Glc-О-Mal
5.49	299.1	321.1	—	Изомер афрормозина

Примечание: \* – время удерживания на хроматографической колонке, мин; \*\* – данные масс-спектров (указаны значения  $m/z$  для обнаруженных ионов). Обозначения: Glc – остаток глюкопиранозы; Mal – остаток малоновой кислоты.

**Таблица 3.** Результаты исследования антимикробной активности образцов экстрактов по отношению к *Staphylococcus aureus* после 3.5 часов инкубирования

№	Всего	Живые	Мертвые	Живые клетки, % к k+ (жив)	Мертвые клетки, % от всего клеток
	Кл × 10 <sup>7</sup> /мл				
<b>10 мкл</b>					
k+	16.96	16.90	0.06	—	0.36
<b>+ <i>A. persarum</i></b>					
1.	6.79 ± 0.32	6.29 ± 0.32	0.46 ± 0.07	37.23 ± 1.92	6.92 ± 1.06
<b>20 мкл</b>					
k+	16.08	15.92	0.16	—	1.01
<b>+ <i>A. persarum</i></b>					
2.	5.55 ± 0.11	4.90 ± 0.09	0.65 ± 0.04	30.78 ± 0.74	11.77 ± 0.58
<b>30 мкл</b>					
k+	14.47	14.14	0.33	—	2.31
<b>+ <i>A. persarum</i></b>					
3.	4.43 ± 0.17	3.80 ± 0.18	0.63 ± 0.05	26.89 ± 1.34	14.19 ± 1.20

Примечание: k+ – положительный контроль.

**Таблица 4.** Результаты исследования антимикробной активности образцов экстрактов по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* после 3.5 часов инкубирования

№	Всего	Живые	Мертвые	Живые клетки, % к k+ (жив)	Мертвые клетки, % от всего клеток
	кл × 10 <sup>7</sup> /мл				
<b>30 мкл</b>					
k+	12.06	11.92	0.14	—	1.19
<b>+ <i>A. persarum</i></b>					
1.	11.02 ± 0.55	10.92 ± 0.95	0.10 ± 0.03	91.64 ± 4.62	0.94 ± 0.32

Примечание: k+ – положительный контроль.

**Таблица 5.** Результаты исследования антимикробной активности образцов экстрактов по отношению к *Staphylococcus aureus* после 20 ч инкубирования

№	Всего	Живые	Мертвые	Живые клетки, % к k+ (жив)	Мертвые клетки, % от всего клеток
<b>10 мкл</b>					
k+	18.80	18.02	0.78	—	4.15
<b>+ <i>A. persarum</i></b>					
1.	10.83 ± 0.16	9.90 ± 0.10	0.93 ± 0.90	54.94 ± 0.94	8.55 ± 0.70
<b>20 мкл</b>					
k+	19.75	18.93	0.82	—	4.16
<b>+ <i>A. persarum</i></b>					
2.	5.31 ± 0.52	4.21 ± 0.53	1.10 ± 0.02	22.24 ± 2.82	20.76 ± 2.37
<b>30 мкл</b>					
k+	19.72	18.81	0.91	—	4.61
<b>+ <i>A. persarum</i></b>					
3.	3.96 ± 0.23	2.35 ± 0.08	1.61 ± 0.28	12.49 ± 0.44	40.45 ± 5.00

Примечание: k+ – положительный контроль

до 20 и 30 мкл (табл. 3). В то же время наблюдали отсутствие подавляющей активности в отношении *P. aeruginosa* даже после добавления 30 мкл экстракта (табл. 4). Исходя из этого, на долгосрочное инкубирование (20 ч) были оставлены только смеси экстрактов с *S. aureus*. Как видно из данных (табл. 5), антимикробная активность по отношению к *S. aureus* сохранилась после долгосрочного инкубирования. При этом, как и при 3.5 ч инкубирования, с повышением концентрации экстракта происходило усиление ингибиторной активности. Однако полного подавления роста бактериальной культуры не наблюдали ни в одном варианте.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной работы впервые была получена суспензионная культура клеток *A. persarum* и был проведен комплексный анализ ее ростовых показателей при выращивании в различных системах. Полученные результаты позволяют заключить, что полученная линия суспензионной культуры клеток *A. persarum* характеризуется интенсивным ростом. При этом основные ростовые характеристики при выращивании исследуемой культуры в биореакторах незначительно отличались от таковых при выращивании в колбах, что в перспективе делает возможным дальнейшее масштабирование процесса культивирования до биореакторов большего объема [18, 19]. Индекс роста, а также распределение и длительность ростовых

фаз в цикле культивирования *A. persarum* в целом сходны с исследованными ранее суспензионными культурами клеток других видов, например, *Polyscias filicifolia* (C. Moore ex E. Fourn.) L.H. Bailey и *Dioscorea deltoidea* Wall. [18, 19], однако для культуры *A. persarum* характерны более высокие показатели накопления сухого и сырого веса.

Показано, что в культивируемых *in vitro* клетках сохраняется способность к образованию вторичных метаболитов. С использованием УЭЖХ ЭРМС установлено, что обнаруженные соединения относятся к группе изофлавонов. Это соответствует данным, полученным ранее для каллусных культур клеток [16]. Вторичные метаболиты, обнаруженные в культуре клеток *A. persarum* широко распространены среди растений семейства *Fabaceae* [25]. Однако у представителей рода *Alhagi spp.* изофлавоны встречаются сравнительно редко [15, 23]. В частности, в доступной литературе практически отсутствуют данные о наличии малонилированных гликозидов изофлавонов у растений *Alhagi spp.* Следует подчеркнуть, что в настоящей работе идентификация соединений выполнена на основе исключительно данных масс-спектрометрии. Для более строгого структурного описания обнаруженных соединений требуются дополнительные исследования.

Был проведен первичный скрининг антимикробной активности комплексных экстрактов из клеточной биомассы полученной суспензионной культуры клеток *A. persarum* с использованием тест-систем культур клеток золотистого стафило-

кокка *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *S. aureus* остается одним из важнейших возбудителей инфекций человека, вызывая широкий спектр заболеваний: от легких и средней тяжести поражений кожи и мягких тканей до угрожающих жизни пневмонии, сепсиса, септикопиемии и синдрома токсического шока [26]. *P. aeruginosa* — основной возбудитель псевдомонадных инфекций у человека и может входить в состав его нормальной микрофлоры. Она легко приспосабливается к большинству антибиотиков, устойчива даже к очень высоким их концентрациям. Целый ряд особенностей позволяет синегнойной палочке также лидировать по частоте возникновения и внутрибольничных инфекций [27].

В процессе поиска новых и совершенствования уже имеющихся средств подавления данных возбудителей исследователи все чаще обращаются к препаратам на растительной основе, а изоляты патогенов используются как тест-системы для определения антимикробной активности экстрактов лекарственных растений [28, 29]. Показано, что эффективность последних в качестве антимикробных средств может быть видоспецифична. Например, из препаратов 12 лекарственных растений только экстракты *Dacryodes edulis*, *Occimum gratissimum*, *Commelina erecta* и *Spilanthes filicaulis* проявляли ингибирующую активность в отношении как минимум 6 из 11 клинических изолятов *S. aureus* [29]. Метанольный экстракт (1%) ризома *Berginia ciliate* ингибировал формирование биопленки у *P. aeruginosa* (РАО1) более чем на 80% по сравнению с контролем, причем наблюдали положительную корреляцию ингибирующего эффекта и содержания в экстракте флавоноидов [30]. В нашей работе в результате проведенного первичного скрининга было показано, что экстракты культуры клеток *A. persarum* проявляли специфическую подавляющую активность к *S. aureus*, однако не проявляли ее по отношению к *P. aeruginosa*. Это может быть связано со специфичностью действия данного вида растений по отношению к грамположительным (*S. aureus*) микроорганизмам. Однако для подтверждения или опровержения этой теории и для получения более выраженного эффекта необходимы дальнейшие исследования, в частности — по подбору минимальных ингибирующих концентраций экстрактов культур клеток.

Исследования по получению культуры клеток, выращиванию в колбах, анализу вторичных соединений и антимикробной активности выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (договор № 18-54-06021 (Аз\_а)). Работы по культивированию культуры клеток в биореакторах выполнены при поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1882). Все работы были проведены с использованием оборудования

Уникальных научных установок “Опытный биотехнологический комплекс” и “Всероссийская коллекция культур клеток высших растений” на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРКК ВР ИФР РАН).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alqasoumi S.I., Al-Rehaily A.J., Al Sheikh A.M. AbdelKader M.S. Evaluation of the hepatoprotective effect of *Ephedra foliate*, *Alhagi maurorum*, *Capsella bursa-pastoris*, and *Hibiscus sabdariffa* against experimentally induced liver injury in rats // Nat. Prod. Sci. 2008. V. 14. P. 95.
2. Naseri M.K.G., Mard S.A. Gastroprotective effect of *Alhagi maurorum* on experimental gastric ulcer in rats // Pak. J. Med. Sci. 2007. V. 23. P. 570.
3. Shaker E., Mahmoud H., Mnaa S. Antiinflammatory and anti-ulcer activity of the extract from *Alhagi maurorum* (camelthorn) // Food Chem. Toxicol. 2010. V. 48. P. 2785.
4. Neamah N.F. A Pharmacological evaluation of aqueous extract of *Alhagi maurorum* // Global Journal of Pharmacology. 2012. V. 6. P. 41.
5. Marashdah M.S., Al-Hazimi H.M. Pharmacological activity of ethanolic extract of *Alhagi maurorum* roots // Arab. J. Chem. 2010. V. 3. P. 39.
6. Marashdah M.S., Farraj A.I. Pharmacological activity of 2% aqueous acetic acid extract of *Alhagi maurorum* roots // J. Saudi Chem. Soc. 2010. V. 14. P. 247.
7. Abu-Taleb A.M., El-Deeb K., Al-Otibi F.O. Bioactivity of some plant extracts against *Drechslera biseptata* and *Fusarium solani* // J. Food Agric. Environ. 2011. V. 9. P. 769.
8. Rahman S.M.A., Abd-Ellatif S.A., Deraz S.F., Khalil A.A. Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. P. 10733.
9. Towhidi A., Zhandi M. Chemical composition, in vitro digestibility and palatability of nine plant species for dromedary camels in the province of Semnan // Iran. Egypt J. Biol. 2007. V. 9. P. 47.
10. Piri A., Palangi A., Eivazi P. The determination of nutritive value of *Alhagi* by in situ and gas production techniques // Eur. J. Exp. Biol. 2012. V 2. P. 846.
11. Muhammad G., Hussain M.A., Anwar F., Ashraf M., Gilani A.H. *Alhagi*: a plant genus rich in bioactives for pharmaceuticals // Phytother. Res. 2015. V. 29. P. 1.
12. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro*. Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 873.

13. *Bharal S., Rashid A.* Tissue culture of *Alhagi camelorum* – a legume of high regenerative capacity // *Physiol. Plant.* 1981. V. 3. P. 497.
14. *Hassanein A.M., Mazen A.M.A.* Adventitious bud formation in *Alhagi graecorum* // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 2001. V. 65. P. 31.
15. *Dhaniya S., Parihar S.K.* In vitro callus induction and multiplication of inter-nodal explants in plants *Dicoma tomentosa* and *Alhagi maurorum* // *J. of Drug Delivery and Therapeutics.* 2019. V. 9. P. 212.
16. *Тимова М.В., Кочкин Д.В., Собољкова Г.И., Фоменков А.А., Сидоров Р.А., Носов А.М.* Получение и характеристика каллусных культур клеток *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse – продуцентов флавоноидов // *Биотехнология.* 2020. Т.36. С. 35.
17. *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* 1968. V. 50. P. 51.
18. *Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V.* Isoprenoid Production via Plant Cell Cultures: Biosynthesis, Accumulation and Scaling-Up to Bioreactors // *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology* / Eds. Paek K.-Y. Murthy H.N., Zhong J.-J. Netherlands: Springer, 2014. P. 563.
19. *Titova M.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Ivanov I.M., Sukhanova E.S., Nosov A.M.* Features of respiration and formation of steroidal glycosides in *Dioscorea deltoidea* cell suspension culture grown in flasks and bioreactors // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 557.
20. *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: Бинном. 2011. С. 386.
21. *Abrankó L., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A.* In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2011. V. 46. P. 478.
22. *Zhang J., Xu X.J., Xu W., Huang J., Zhu D.Y., and Qiu X.H.* Rapid characterization and identification of flavonoids in *Radix Astragali* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry // *J. Chromatogr. Sci.* 2015. V. 53. P. 945.
23. *Lee Y.H., Kim B., Hwang S.-R., Kim K., Lee J.H.* Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antioxidant properties through different solvent systems // *Journal of Food and Drug Analysis.* 2018. V. 26. P. 277.
24. *Zheng Y., Duan W., Sun J., Zhao C., Cheng Q., Li C., Peng G.* Structural identification and conversion analysis of malonyl isoflavonoid glycosides in *Astragali Radix* by HPLC coupled with ESI-Q TOF/MS // *Molecules.* 2019. V. 24. P. 929.
25. *Wink M.* Evolution of secondary metabolites in legumes (*Fabaceae*) // *S. Afr. J. Bot.* 2013. V. 89. P. 164.
26. *Tong S.Y.C., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management // *Jr. Clin. Microbiol. Rev.* 2015. V. 28. P. 603.
27. *Hellen G.* Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2000. V. 16. P. 103.
28. *Ulloa-Urizar G., Aguilar-Luis M.A., De Lama-Odría M.C., Camarena-Lizazaburu J., del Valle Mendoza J.* Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against *Pseudomonas aeruginosa* // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2015. V. 5. P. 928.
29. *Sama Fonkeng L., Mouokeu R.S., Tume C., Njateng G.S., Kamcthueng M.O., Ndonkou N.J., Kuate J.R.* Anti-*Staphylococcus aureus* activity of methanol extracts of 12 plants used in Cameroonian folk medicine // *BMC Res. Notes.* 2015. V. 24. P. 710.
30. *Alam K., Al Farraj D.A., Mah-e-Fatima S., Yameen M.A., Elshikh M.S., Alkufeidy R.M., Mustafa A.E.Z.M.A., Bhasme P., Alshammari M.K., Alkubaisi N.A., Abbasi A.M., Naqvi T.A.* Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen – *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // *J. Inf. Public Health.* 2020.

УДК 581.1

## ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ХЛОРОПЛАСТОВ *Cucumis sativus* L. И *Secale cereale* L. ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ЗАКАЛИВАНИИ

© 2021 г. В. Н. Попов<sup>а</sup>, \*, Н. В. Астахова<sup>а</sup>

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

\*e-mail: vnpopov@mail.ru

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.

После доработки 17.12.2020 г.

Принята к публикации 17.12.2020 г.

Исследовали изменение ультраструктуры хлоропластов у теплолюбивых (огурец обыкновенный, *Cucumis sativus* L.) и морозостойких (рожь посевная озимая, *Secale cereale* L.) растений при низкотемпературном закаливании. Установлено, что в результате закаливания у обоих видов происходило снижение суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте на 20–30%. Это достигалось за счет снижения длины мембран гранальных и стромальных тилакоидов у огурца, а также за счет снижения длины мембран гранальных тилакоидов при сохранении длины мембран тилакоидов стромы у озимой ржи. При этом у растений огурца происходило уменьшение площади хлоропласта и увеличение площади крахмального зерна более чем в 3 раза. У озимой ржи после закаливания площадь хлоропласта увеличивалась, а крахмальные зерна полностью отсутствовали. *S. cereale* и *C. sativus* сохраняли фотосинтез при закалывающих температурах, хотя его интенсивность снижалась в 2–3 раза по сравнению с контролем. У обоих видов увеличивалось содержание растворимых сахаров в листьях: у огурца – на 20%, а у озимой ржи – более чем в 3 раза. Сделан вывод о том, что накопление крахмала в хлоропластах огурца свидетельствовало о выведении значительной части продуктов фотосинтеза из осмотического пула, что ограничивало эффективность закаливания *C. sativus*. Растения озимой ржи за счет реорганизации тилакоидной системы, а также благодаря отсутствию синтеза крахмала в хлоропластах,кратно увеличивали содержание растворимых сахаров в клетках, что обеспечивало высокую эффективность низкотемпературного закаливания этих растений.

**Ключевые слова:** *Cucumis sativus*, *Secale cereale*, ультраструктура хлоропластов, фотосинтез, сахара, низкотемпературное закаливание

DOI: 10.31857/S0015330321040138

### ВВЕДЕНИЕ

Низкотемпературное закаливание растений рассматривается как процесс формирования свойств холодо- и морозостойкости растений в соответствующих генотипу условиях и всегда сопровождается перестройкой ультраструктуры клеток и хлоропластов [1]. Изменения в ультраструктурной организации хлоропластов имеют особое значение, поскольку считается, что они направлены на сохранение фотосинтеза и обеспечение растений ассимилянтами при низких температурах, что является необходимым условием приобретения устойчивости к холоду [2].

В литературе имеются многочисленные и довольно противоречивые сведения, касающиеся

изменения ультраструктуры хлоропластов в условиях низких температур. Наиболее характерные особенности реорганизации хлоропластов при низкотемпературном закаливании можно разделить на три группы. К первой относятся изменения размеров и формы хлоропластов, ко второй – изменения мембранной системы хлоропластов, а к третьей группе – изменения числа и размеров пластоглобул и крахмальных зерен [3]. Ряд авторов наблюдали увеличение площади хлоропластов у теплолюбивых растений огурца [4] и фасоли [5], холодостойких растений картофеля [6] и морозостойкой озимой пшеницы [7].

Изменения структуры мембранной системы хлоропластов в условиях низких температур описаны для разных видов растений. Так, у теплолюбивых растений табака за время низкотемпературного закаливания происходило снижение числа гран в хлоропласте одновременно с уменьшением площади

**Сокращения:** ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин; МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ФС I – фотосистема I; ФС II – фотосистема II.

одной грани, что приводило к 30% снижению суммарной площади гран в хлоропластах [8]. Хлоропласты растений ячменя в условиях закаливающей температуры демонстрировали уменьшение числа тилакоидов в грани, причем расположение тилакоидов становилось более плотным, с заметным уменьшением пространства между ними [9]. У растений морозостойкой озимой пшеницы наблюдали уменьшение площади гран в хлоропластах и снижение количества тилакоидов в грани при закаливании [10]. Как правило, такие изменения в мембранной системе растений трактуются с точки зрения защиты от фотоингибирования ФС II, компоненты которой в основном локализованы в тилакоидах грани [11].

Пластоглобулы, по современным представлениям, рассматриваются как липопротеидные частицы, включающие белки, триацилглицерины, токоферолы, а также свободные жирные кислоты [12]. Пластоглобулы в хлоропластах служат для накопления резервных высокоэнергетических метаболитов, участвуют в формировании тилакоидных мембран, регуляции фотосинтеза и метаболизме жасмоновой кислоты [12]. Как правило, при закаливании происходит увеличение площади и числа пластоглобул у морозостойких растений, таких как озимая пшеница и рожь [13]. У теплолюбивых растений наблюдали как увеличение числа пластоглобул (у фасоли [14]), так и полное их отсутствие (у томата и огурца [15]).

Площадь и количество крахмальных зерен в хлоропластах очень динамично изменяются в ответ на действие холода. Даже у одного вида растений (*Arabidopsis thaliana* Heunh. (L.) одни исследователи наблюдали гидролиз крахмальных зерен в хлоропластах [16], а другие фиксировали накопление крахмала в хлоропластах при закаливании [17].

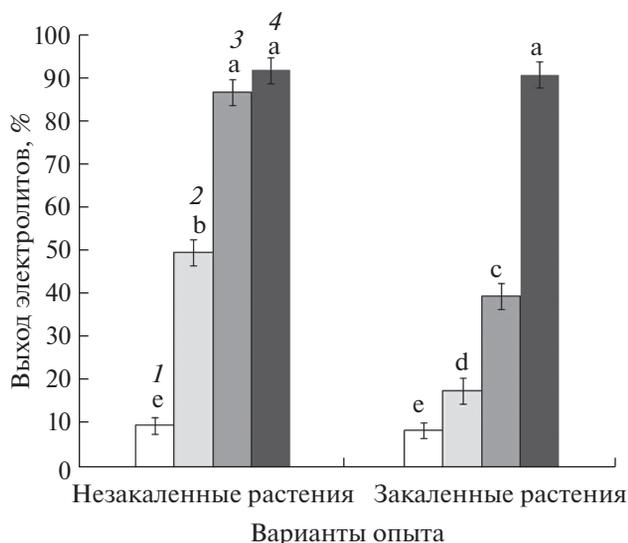
Таким образом, представленные в литературе противоречивые данные не позволяют сделать однозначный вывод о роли изменений ультраструктуры хлоропластов в низкотемпературном закаливании теплолюбивых и морозостойких растений. Результаты экспериментов сильно варьируют в зависимости от видовой специфики, возраста растений и режимов низкотемпературного закаливания. В связи с этим, целью нашей работы было сравнительное исследование изменений ультраструктуры хлоропластов двух контрастных по отношению к температуре видов растений: экстремально теплолюбивого огурца и морозостойкой озимой ржи в связи с их способностью осуществлять фотосинтез в условиях кратковременного (5 сут) низкотемпературного закаливания. У обоих видов растений, наряду с ультраструктурной организацией хлоропластов, изучали холодоустойчивость, CO<sub>2</sub>-газообмен и изменения в накоплении растворимых сахаров в результате низкотемпературного закаливания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** Объектами исследования являлись теплолюбивые растения огурца обыкновенного (*Cucumis sativus* L., сорт Конкурент) и морозостойкие растения ржи посевной озимой (*Secale cereale* L., сорт Пурга). Растения выращивали в вазонах с почвой объемом 250 мл в камерах фитотрона ИФР РАН при температуре 22°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с). Возраст растений в начале экспериментов составлял 4 недели. Закаливание растений проводили в течение 5 сут в климатической камере KBW-240 ("Binder", Германия) при следующих условиях: огурец – температура +12°C, 16-часовой фотопериод и освещенность 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), озимая рожь – температура +2°C, 16-часовой фотопериод и освещенность 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с). Данные режимы закаливания были подобраны в ходе предварительных опытов. Контрольные растения оставляли при температуре 22°C в камерах фитотрона ИФР РАН.

**Устойчивость растений к гипотермии.** Для оценки устойчивости *C. sativus* и *S. cereale* к низким температурам незакаленные и закаленные растения обоих видов тестировали в климатической камере MIR-153 ("Sanyo", Япония) в ходе трех отдельных экспериментов: 3°C 1 сут, 0°C 1 сут, –3°C 1 сут для огурца и –3°C 1 сут, –6°C 1 сут, –9°C 1 сут для озимой ржи. Степень устойчивости незакаленных и закаленных растений оценивали по выходу электролитов (в %) из листовой ткани в водную фазу. Для этого электропроводность водных экстрактов определяли при помощи кондуктометра SG7-ELK ("Mettler Toledo", Швейцария). Выход электролитов из тканей листьев (*V*, в %) рассчитывали по формуле:  $V = 100 \times (L_o/L_k)$ , где *L<sub>o</sub>* – электропроводность исследуемого образца до или после холодовой экспозиции и *L<sub>k</sub>* – электропроводность того же образца после кипячения [18].

**Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры хлоропластов.** Для получения препаратов для микроскопии использовали фрагменты из срединной части четвертого листа *C. sativus* и *S. cereale*. Фрагменты листьев незакаленных и закаленных растений отбирали в середине светового дня и фиксировали в течение четырех часов 2.5% глутаровым альдегидом в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) при температуре 4°C. После 4-кратной промывки фосфатным буфером материал фиксировали 1% водным раствором OsO<sub>4</sub>, обезвоживали последовательно растворами этанола в возрастающих концентрациях и ацетоном, а затем заливали в Epon-812. Ультратонкие срезы листьев растений получали на ультрамикротоме LKB3 ("LKB", Швеция). Срезы просматривали при помощи электронного микроскопа LIBRA120 ("ZEISS", Германия) сначала при увеличении ×400 для отбора клеток столбчатого мезофилла



**Рис. 1.** Выход электролитов (%) из клеток листьев незакаленных и закаленных растений огурца, подвергнутых охлаждению и промораживанию (1 – до охлаждения и промораживанию, 2 – после охлаждения при температуре 3°C в течение 1 сут, 3 – после охлаждения при температуре 0°C в течение 1 сут, 4 – после промораживания при температуре –3°C в течение 1 сут). Достоверные различия средних значений при  $P < 0.05$  отмечены разными латинскими буквами над барами.

листьев огурца и первого субэпидермального слоя мезофилла листьев озимой ржи, а затем в отобранных клетках просматривали хлоропласты при увеличении  $\times 4000$ . Морфометрию хлоропластов проводили при помощи встроенного программного обеспечения электронного микроскопа LIBRA120 (“ZEISS”, Германия), при этом просматривали не менее 150 хлоропластов каждого варианта [19]. Измеряли площадь среза хлоропласта, грани, крахмального зерна, пластоглобулы, а также число гран, крахмальных зерен и пластоглобул на срезе хлоропласта. Суммарную длину мембран тилакоидов в хлоропласте определяли путем сложения длин мембран гранальных и стромальных тилакоидов. Коэффициент гранальности хлоропластов рассчитывали как отношение длины мембран гранальных тилакоидов к длине мембран тилакоидов, имеющих контакт со стромой.

**CO<sub>2</sub>-газообмен растений.** Измерение CO<sub>2</sub>-газообмена растений *C. sativus* и *S. cereale* проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (Германия) при интенсивности освещения 500 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) для огурца и 800 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) для озимой ржи. Содержание CO<sub>2</sub> в продуваемом через листовую камеру воздухе составляло 380 ppm. Измерения проводили у контрольных растений огурца и озимой ржи (при температуре 22°C) и у растений после процедуры низкотемпературного закаливания (при температурах 12°C для огурца и 2°C для озимой ржи), т.е.

при температурах, идентичных температурам вегетации и холодого закаливания. Длительность единичного измерения составляла не менее 20 мин на свету после достижения постоянной скорости ассимиляции CO<sub>2</sub> и 20 мин после выключения света. Определение сухой массы листьев проводили путем их высушивания при температуре 80°C до постоянного веса. Измерения газообмена включали определение скорости видимой ассимиляции CO<sub>2</sub> и темнового дыхания, которые выражали в мг CO<sub>2</sub>/(г сухой массы ч). На основе этих параметров рассчитывали отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание [20].

**Определение содержания сахаров.** Навески листьев и корней *C. sativus* и *S. cereale* (~500 мг) отбирали в середине светового дня и фиксировали 96% кипящим этанолом. Ткань растирали в фарфоровой ступке и сахара извлекали трехкратной экстракцией 80% этанолом. В полученных экстрактах определяли содержание глюкозы – глюкозооксидазным методом, сахарозы и фруктозы – по методу Рое. Полученные результаты выражали в мг/г сухой массы [21].

Во всех экспериментах биологическая повторность измерений была 6-кратной, аналитическая – 3–4-кратной. Каждый эксперимент повторяли не менее 3–4 раз. При морфометрических исследованиях обработку полученных результатов проводили на основании данных по 150 хлоропластам каждого варианта. Результаты экспериментов обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На гистограммах представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями оценена по *t*-критерию Стьюдента для 95% уровня значимости ( $P < 0.05$ ). Достоверно различающиеся между собой величины обозначены разными надстрочными буквами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Устойчивость растений C. sativus и S. cereale к гипотермии*

Данные по выходу электролитов из листьев исследуемых растений представлены на рисунках 1 и 2. Выход электролитов у растений огурца при температурах вегетации (22°C) и закаливания (12°C) находился на уровне 9 – 10%. Незакаленные растения огурца демонстрировали 5-кратный рост выхода электролитов (до 50%) уже после обработки низкой положительной температурой 3°C в течение 1 сут. При температурах 0 и –3°C выход электролитов достигал 87–92%, и все незакаленные растения погибли. Растения огурца, прошедшие процедуру низкотемпературного закаливания, сохраняли свою жизнеспособность после действия температур 3 и 0°C (выход электролитов 18 и 40%, соответственно), и погибли

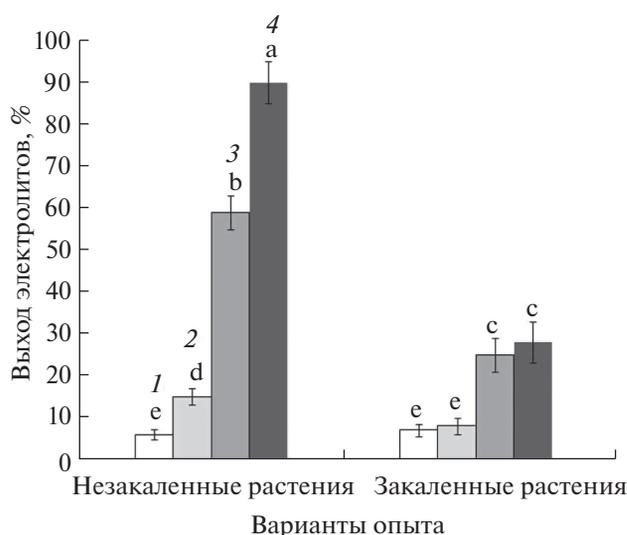
только после применения отрицательной температуры  $-3^{\circ}\text{C}$ , когда выход электролитов достигал 90%.

Величина выхода электролитов у озимой ржи при температурах вегетации ( $22^{\circ}\text{C}$ ) и закаливания ( $2^{\circ}\text{C}$ ) составляла 6–7%. У незакаленных растений озимой ржи после промораживания при температуре  $-3^{\circ}\text{C}$  значение выхода электролитов возросло лишь до 15%, существенный уровень поврежденных (выход электролитов около 60.0%) наблюдался только после промораживания при температуре  $-6^{\circ}\text{C}$ , а гибель наступала при температуре  $-9^{\circ}\text{C}$ . Закаленные растения озимой ржи выживали после промораживания во всем диапазоне температур от  $-3$  до  $-9^{\circ}\text{C}$ , а выход электролитов не превышал 30% даже при температуре промораживания  $-9^{\circ}\text{C}$ .

*Ультраструктурная организация хлоропластов растений C. sativus и S. cereale*

Электронно-микроскопические наблюдения показали, что строение клеток столбчатого мезофилла листьев огурца и первого субэпидермального слоя мезофилла листьев озимой ржи представлено слоем цитоплазмы и центральной вакуолюю. Хлоропласты обоих видов исследуемых растений имели удлиненно-овальную или округлую форму и всегда располагались в цитозоле вдоль клеточных стенок.

Морфометрические исследования показали, что в процессе закаливания растений огурца наблюдались существенные изменения в ультраструктурной организации хлоропластов (рис. 3а, б). Можно отметить снижение площади хлоропласта более чем на 10% (с 16.27 до 14.54  $\mu\text{m}^2$ ) и увеличение площади крахмального зерна более чем в 3 раза (табл. 1). При этом количество крахмальных зерен в хлоропласте оставалось неизменным. При закаливании площадь пластоглобулы не изменялась, а количе-



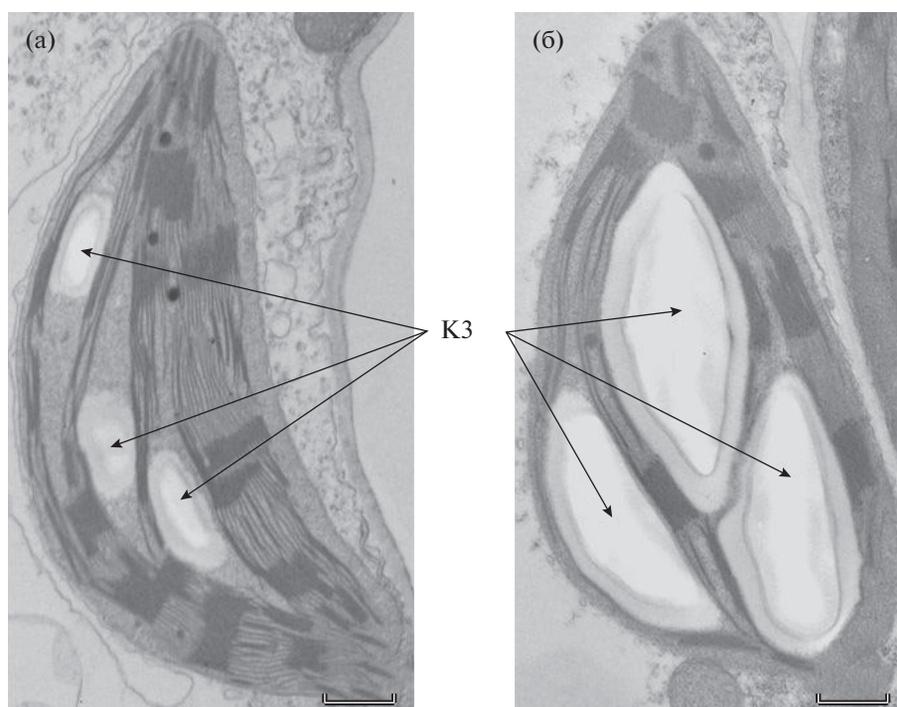
**Рис. 2.** Выход электролитов (%) из клеток листьев незакаленных и закаленных растений озимой ржи, подвергнутых промораживанию (1 – до промораживания, 2 – после промораживания при температуре  $-3^{\circ}\text{C}$  в течение 1 сут, 3 – после промораживания при температуре  $-6^{\circ}\text{C}$  в течение 1 сут, 4 – после промораживания при температуре  $-9^{\circ}\text{C}$  в течение 1 сут). Достоверные различия средних значений при  $P < 0.05$  отмечены разными латинскими буквами над барами.

ство пластоглобул в хлоропласте снижалось более чем на 30% (табл. 1). Что касается изменения ультраструктуры тилакоидной системы хлоропластов, то за время низкотемпературного закаливания площадь одной грани и число гран на срезе хлоропласта достоверно не изменялись (табл. 2). При закаливании происходило снижение суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте (с 206.1 до 172.2  $\mu\text{m}$ ) в результате снижения длины мембран как гранальных, так и стромальных тилакоидов. Коэффициент гранальности при этом не изменялся.

**Таблица 1.** Изменение площади и числа структурных элементов хлоропластов листьев растений огурца и озимой ржи при низкотемпературном закаливании

Показатель	Огурец		Озимая рожь	
	незакаленные растения	закаленные растения	незакаленные растения	закаленные растения
Площадь среза, $\mu\text{m}^2$ :				
хлоропласта	16.27 ± 0.49 <sup>a</sup>	14.54 ± 0.65 <sup>b</sup>	11.36 ± 0.37 <sup>c</sup>	12.32 ± 0.29 <sup>d</sup>
крахмального зерна	0.76 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.48 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.05 <sup>c</sup>	–
пластоглобулы	0.02 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.005 <sup>a</sup>
Число на срезе хлоропласта, шт.:				
крахмальных зерен	2.92 ± 0.31 <sup>a</sup>	2.89 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.15 <sup>b</sup>	–
пластоглобул	6.44 ± 0.45 <sup>a</sup>	4.08 ± 0.51 <sup>b</sup>	13.30 ± 0.36 <sup>c</sup>	14.48 ± 0.42 <sup>d</sup>

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



**Рис. 3.** Изменение ультраструктуры хлоропластов растений огурца при низкотемпературном закаливании (а – незакаленные растения, б – закаленные растения). КЗ – крахмальное зерно. Масштабная шкала – 1 мкм.

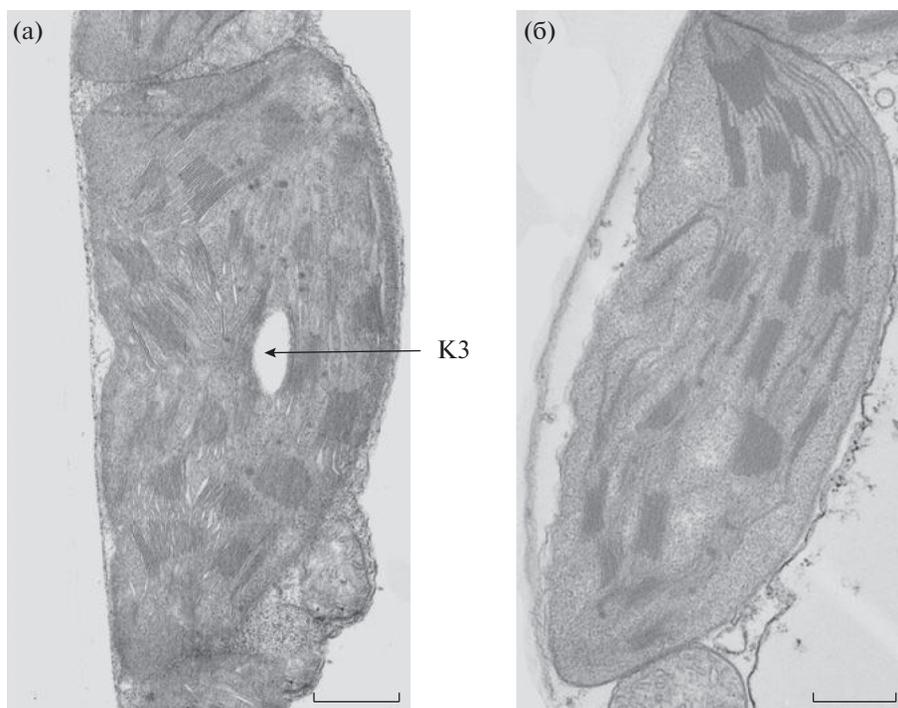
У растений озимой ржи за время низкотемпературного закалывания происходило увеличение площади хлоропластов почти на 10% (с 11.36 до 12.32 мкм<sup>2</sup>) (табл. 1). Площадь пластоглобулы не изменялась, а их количество в хлоропласте увеличивалось почти на 10% (табл. 1). После закалывания крахмальные зерна в хлоропластах полностью отсутствовали (рис. 4а, б). У озимой ржи, как и у огурца, в процессе закалывания площадь одной грани и число гран в хлоропласте досто-

верно не изменялись (табл. 2). При этом наблюдалось снижение суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте (с 164.6 до 127.3 мкм). Но, в отличие от огурца, у растений озимой ржи это снижение происходило за счет уменьшения длины мембран гранальных тилакоидов. Протяженность мембран стромальных тилакоидов оставалась без изменений, в результате чего коэффициент гранальности снижался с 1.7 до 1.2 (табл. 2).

**Таблица 2.** Изменение ультраструктуры тилакоидной системы хлоропластов листьев растений огурца и озимой ржи при низкотемпературном закаливании

Показатель	Огурец		Озимая рожь	
	незакаленные растения	закаленные растения	незакаленные растения	закаленные растения
Площадь среза грани, мкм <sup>2</sup>	0.09 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.04 <sup>a</sup>
Число гран на срезе, шт.	21.52 ± 5.10 <sup>a</sup>	19.10 ± 4.82 <sup>a</sup>	21.02 ± 4.91 <sup>a</sup>	20.47 ± 5.22 <sup>a</sup>
Длина мембран гранальных тилакоидов, мкм	127.6 ± 8.1 <sup>a</sup>	106.6 ± 9.2 <sup>b</sup>	103.4 ± 8.7 <sup>b</sup>	69.2 ± 7.5 <sup>c</sup>
Длина мембран стромальных тилакоидов, мкм	78.5 ± 4.6 <sup>a</sup>	65.6 ± 5.2 <sup>b</sup>	61.2 ± 5.4 <sup>b</sup>	58.1 ± 6.2 <sup>b</sup>
Суммарная длина мембран тилакоидов в хлоропласте, мкм	206.1 ± 12.5 <sup>a</sup>	172.2 ± 14.2 <sup>b</sup>	164.6 ± 13.6 <sup>b</sup>	127.3 ± 14.3 <sup>c</sup>
Коэффициент гранальности	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>b</sup>

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



**Рис. 4.** Изменение ультраструктуры хлоропластов растений озимой ржи при низкотемпературном закаливании (а – незакаленные растения, б – закаленные растения). КЗ – крахмальное зерно. Масштабная шкала – 1 мкм.

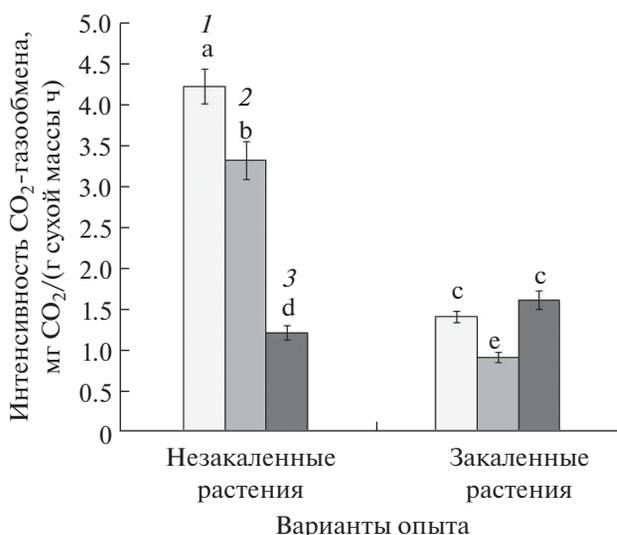
*CO<sub>2</sub>-газообмен растений C. sativus и S. cereale*

При закаливании растений наблюдались существенные изменения  $CO_2$ -газообмена у обоих исследуемых видов. У огурца интенсивность видимого фотосинтеза снижалась в 3 раза (с 4.2 до 1.4 мг  $CO_2$ /г сухой массы ч), а интенсивность темнового дыхания – в 3.5. Это приводило к росту отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание всего на 25% (рис. 5). У озимой ржи величина видимого фотосинтеза за время закаливания уменьшалась только в 2 раза (с 14.5 до 6.9 мг  $CO_2$ /г сухой массы ч), а интенсивность темнового дыхания снижалась, как и у огурца, в 3.5 раза. За счет этого у озимой ржи происходило увеличение отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание более чем в 1.5 раза (рис. 6).

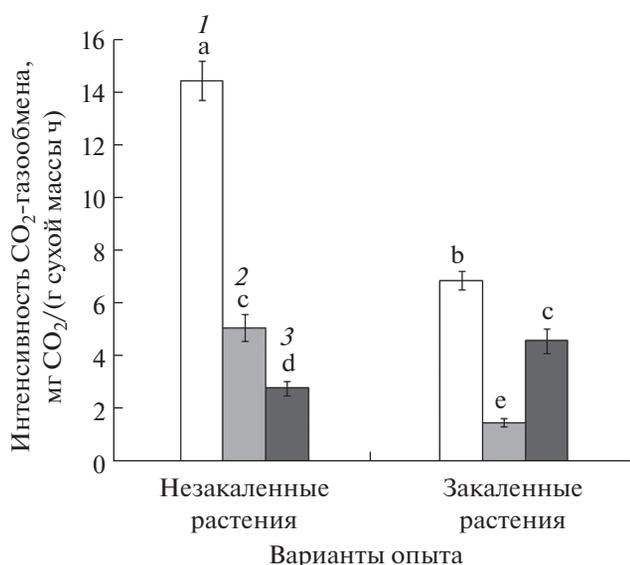
*Содержание сахаров в листьях и корнях C. sativus и S. cereale*

Данные по изменению содержания сахаров в листьях и корнях растений огурца при низкотемпературном закаливании представлены в таблице 3. За время низкотемпературного закаливания в листьях огурца наблюдался ~20% рост содержания суммарного количества растворимых сахаров (с 12.5 до 16.2 мг/г сухой массы), который достигался за счет увеличения содержания фруктозы (в 3 раза) и глюкозы (в 1.5 раза). Содержания сахарозы в листьях огурца снижа-

лось на 25%. В корнях, в отличие от листьев, суммарное количество растворимых сахаров снижалось на 20% (с 25.5 до 20.2 мг/г сухой массы) за счет уменьшения содержания всех форм сахаров.



**Рис. 5.** Изменение параметров  $CO_2$ -газообмена растений огурца при низкотемпературном закаливании (1 – видимый фотосинтез, 2 – темновое дыхание, 3 – отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание). Достоверные различия средних значений при  $P < 0.05$  отмечены разными латинскими буквами над барами.



**Рис. 6.** Изменение параметров  $\text{CO}_2$ -газообмена растений озимой ржи при низкотемпературном закаливании (1 – видимый фотосинтез, 2 – темновое дыхание, 3 – отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание). Достоверные различия средних значений при  $P < 0.05$  отмечены разными латинскими буквами над барами.

В листьях озимой ржи за время закаливания суммарное содержание сахаров возрастало более чем в 3 раза (с 22.2 до 69.2 мг/г сухой массы) в результате увеличения содержания всех форм сахаров, но особенно сильно за счет накопления глюкозы и сахарозы (табл. 4). В корнях озимой ржи отмечалось увеличение суммарного количества растворимых сахаров в 2 раза (с 38.2 до 76.3 мг/г сухой массы), которое обеспечивалось значительным ростом содержания фруктозы, глюкозы и сахарозы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность низкотемпературного закаливания сильно зависит от видовой специфики ис-

следуемых растений. Одна и та же температура может быть закалывающей для морозостойких видов растений и повреждающей – для теплолюбивых [1]. Именно поэтому мы использовали разные температуры ( $12^\circ\text{C}$  для огурца и  $2^\circ\text{C}$  для озимой ржи) при закаливании и различные температуры (3, 0,  $-3^\circ\text{C}$  для огурца и  $-3$ ,  $-6$ ,  $-9^\circ\text{C}$  для озимой ржи) при оценки устойчивости *C. sativus* и *S. cereale* к гипотермии. Измерение величины выхода электролитов считается одним из достоверных способов оценки степени повреждения растений низкими температурами и широко применяется в научных исследованиях [22].

Полученные нами данные убедительно показали, что оба вида исследуемых растений в результате низкотемпературного закаливания повышали свою устойчивость к гипотермии, но в разной степени. Закаленные растения огурца приобретали способность успешно выдерживать низкие положительные и нулевые температуры, но оказались неспособны сформировать устойчивость к отрицательной температуре. Растения озимой ржи в ходе закаливания существенно повышали свою устойчивость к отрицательным температурам, что характерно для данного вида [23].

Устойчивость растений к холоду во многом зависит от функционирования хлоропластов, реорганизация ультраструктуры которых является одним из факторов низкотемпературного закаливания [24]. Наши исследования выявили ряд существенных изменений в организации тилакоидной системы хлоропластов при закаливании растений огурца и озимой ржи. К числу общих для обоих видов ультраструктурных изменений можно отнести снижение суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте на 20 – 30%. Поскольку при гипотермии интенсивность фотосинтеза лимитируется, главным образом, активностью ключевых ферментов цикла Кальвина [25], то можно предположить, что в хлоропластах растений огурца и озимой ржи происходило снижение длины тилакоидных мембран, избыточных для обеспечения фотосинтетической

**Таблица 3.** Изменение содержания сахаров в листьях и корнях растений огурца при низкотемпературном закаливании

Вариант опыта	Содержание сахаров, мг/г сухой массы			
	фруктоза	глюкоза	сахароза	сумма сахаров
Лист				
Незакаленные растения	$0.8 \pm 0.2^a$	$5.9 \pm 0.5^a$	$5.8 \pm 0.4^a$	$12.5 \pm 0.9^a$
Закаленные растения	$2.3 \pm 0.5^b$	$9.5 \pm 0.3^b$	$4.4 \pm 0.3^b$	$16.2 \pm 1.1^b$
Корень				
Незакаленные растения	$2.5 \pm 0.2^b$	$19.1 \pm 0.9^c$	$3.9 \pm 0.2^b$	$25.5 \pm 1.6^c$
Закаленные растения	$1.9 \pm 0.3^b$	$15.3 \pm 1.2^d$	$3.0 \pm 0.3^c$	$20.2 \pm 1.7^d$

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

**Таблица 4.** Изменение содержания сахаров в листьях и корнях растений озимой ржи при низкотемпературном закаливании

Вариант опыта	Содержание сахаров, мг/г сухой массы			
	фруктоза	глюкоза	сахароза	сумма сахаров
	Лист			
Незакаленные растения	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	12.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	22.2 ± 2.2 <sup>a</sup>
Закаленные растения	3.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	25.1 ± 2.5 <sup>b</sup>	40.4 ± 4.1 <sup>b</sup>	69.2 ± 7.1 <sup>b</sup>
	Корень			
Незакаленные растения	2.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	14.7 ± 1.8 <sup>c</sup>	20.9 ± 1.7 <sup>c</sup>	38.2 ± 4.4 <sup>c</sup>
Закаленные растения	4.9 ± 0.5 <sup>c</sup>	33.3 ± 4.2 <sup>d</sup>	38.1 ± 3.4 <sup>b</sup>	76.3 ± 7.7 <sup>b</sup>

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

активности в условиях закаливающих температур. Важно отметить, что у растений озимой ржи, в отличие от огурца, снижение суммарной длины мембран тилакоидов сопровождалось существенным изменением соотношения длины гранальных и стромальных тилакоидов в хлоропласте. Коэффициент гранальности хлоропластов озимой ржи снижался на 30% за счет уменьшения длины мембран гранальных тилакоидов при сохранении длины мембран тилакоидов стромы на уровне незакаленных растений. Данная перестройка мембранной системы хлоропластов озимой ржи, по-видимому, была направлена на увеличение доли стромальных тилакоидов, содержащих компоненты более устойчивой к холоду ФС I, и на снижение доли гранальных тилакоидов, в которых локализованы компоненты чувствительной к холоду ФС II [11].

Можно предположить, что в результате таких изменений фотосинтетический аппарат озимой ржи окажется более адаптированным к пониженным температурам по сравнению с растениями огурца. Действительно, наши эксперименты показали, что при температурах холодого закаливания интенсивность видимого фотосинтеза у озимой ржи снижалась в 2 раза по сравнению с незакаленными растениями, в то время как у огурца — в 3 раза (рис. 5, 6). Важной особенностью  $\text{CO}_2$ -газообмена растений огурца и озимой ржи являлось то, что интенсивность видимого фотосинтеза за время закаливания уменьшалась в меньшей степени, чем интенсивность темнового дыхания. Это приводило к увеличению отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание, что является предпосылкой накопления большого количества продуктов фотосинтеза в условиях низких температур [20].

Помимо перестройки тилакоидной системы хлоропластов, при закаливании *C. sativus* и *S. cereale* происходили существенные изменения площади хлоропластов и крахмальных зерен. Изменение площади хлоропластов является одной из

наиболее часто встречающихся реакций в ответ на действие холода [10]. Как правило, происходит увеличение площади хлоропластов за счет разбухания их стромы, что связывают с осмотическими явлениями, а именно — с накоплением совместимых осмолитов (сахаров, пролина, глицин-бетаина), которые защищают хлоропласты от обезвоживания, а также выполняют криопротекторные, антиоксидантные и резервные функции [26]. В наших экспериментах наблюдалось уменьшение площади хлоропласта у огурца и её увеличение у озимой ржи примерно на 10%. Такие диаметрально противоположные реакции хлоропластов могут быть связаны с различиями в накоплении и распределении продуктов фотосинтеза в исследуемых растениях. Из данных таблиц 3 и 4 видно, что за время закаливания в листьях огурца суммарное содержание сахаров увеличилось только на 20%, в то время как в листьях озимой ржи — более чем в 3 раза. У огурца в то же время происходил интенсивный синтез крахмала (рост площади крахмальных зерен более чем в 3 раза), а у озимой ржи крахмальные зерна отсутствовали.

Столь значительные различия между растениями огурца и озимой ржи могут быть связаны с особенностями транспорта ассимилятов из листьев в корни у этих растений. Известно, что *C. sativus* имеет преимущественно симпластный транспорт ассимилятов, который отличается крайней чувствительностью к холоду и полностью прекращается при температурах ниже 7–8°C. Напротив, для *S. cereale* свойствен преимущественно апопластный транспорт ассимилятов, который сопряжен с высоким осмотическим давлением клеточного раствора и сохраняется в диапазоне низких положительных температур [27]. Экспериментальные данные по изменению содержания сахаров в корнях огурца и озимой ржи подтверждают это предположение. Снижение содержания растворимых сахаров в корнях огурца в конце периода закаливания может свидетельствовать о торможении оттока ассимилятов и возникновении дефицита сахаров в

корнях. В пользу этой гипотезы свидетельствует и снижение содержания транспортной формы сахаров (сахарозы) не только в корнях, но и в листьях огурца (табл. 3). В отличие от *S. sativus*, в корнях *S. cereale* содержание растворимых сахаров увеличивалось в 2 раза, что дает основания предположить сохранение оттока ассимилятов из листьев в корни в условиях закаливающей температуры (табл. 4).

Обеспечение сахарами всех органов и тканей растения является важнейшим условием для успешного закаливания целого растения к гипотермии [28]. Эта задача достигалась за счет того, что донор ассимилятов – фотосинтез продолжал функционировать у обоих видов исследуемых растений, несмотря на полное подавление низкими температурами основного акцептора ассимилятов – ростовых процессов. Считается, что в таких условиях поддержание фотосинтеза становится возможным благодаря накоплению продуктов фотосинтеза в цитозоле и в новообразованных ультраструктурных элементах клетки (крахмальные зерна, пластоглобулы), а также за счет синтеза более восстановленных химических соединений (МГДГ, ДГДГ, увеличение доли ПНЖК в составе липидов) [29]. Последнее позволяет поддерживать текучесть мембран и сохранять мембрансвязанные функции клеток растений в условиях гипотермии [30].

Таким образом, на основе полученных данных можно констатировать, что у растений *S. sativus* и *S. cereale* реорганизация ультраструктуры хлоропластов была тесно связана с формированием устойчивости к гипотермии. При этом у теплолюбивых растений огурца и у морозостойких растений озимой ржи четко проявлялась видовая специфика в изменении ультраструктурной организации хлоропластов, что во многом определяло эффективность низкотемпературного закаливания данных видов. У растений огурца за время закаливания перестройка ультраструктуры тилакоидной системы ограничивалась лишь снижением суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте и не сопровождалась изменением соотношения длины мембран гранальных и стромальных тилакоидов. Увеличение площади крахмальных зерен в хлоропластах огурца в 3 раза свидетельствовало о выведении значительной части продуктов фотосинтеза из осмотического пула. Такие изменения ультраструктуры хлоропластов огурца, по-видимому, ограничивали продуктивность фотосинтеза и возможность накапливать растворимые сахара, что лимитировало эффективность закаливания *S. sativus* лишь возможностью развивать устойчивость к низким положительным и нулевым температурам.

При закаливании озимой ржи перестройка ультраструктуры тилакоидной системы не ограничивалась лишь снижением суммарной длины мем-

бран тилакоидов в хлоропласте, но и сопровождалась уменьшением коэффициента гранальности хлоропластов. Можно предположить, что формирование хлоропластов с пониженным коэффициентом гранальности, содержащих большую долю устойчивых к холоду мембран стромальных тилакоидов, было направлено на сохранение функциональной активности хлоропластов *S. cereale* в условиях закаливающих температур [3, 4]. Поддержание фотосинтеза на более высоком, чем у огурца уровне, а также отсутствие синтеза крахмала в хлоропластах давало возможностькратно увеличивать содержание растворимых сахаров в клетках озимой ржи. Последнее предотвращало внутриклеточное льдообразование, обеспечивало защиту клеток от обезвоживания в условиях образования льда в межклетниках [2] и тем самым создавало возможность для формирования устойчивости *S. cereale* к отрицательным температурам.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. 54 с.
2. Margesin R., Neuner G., Storey K.B. Cold-loving microbes, plants, and animals – fundamental and applied aspects // *Naturwissenschaften*. 2007. V. 94. P. 77.
3. Venzhik Y.V., Shchyogolev S. Y., Dykman L. A. Ultrastructural reorganization of chloroplasts during plant adaptation to abiotic stress factors // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 850. <https://doi.org/10.1134/S102144371906013X>
4. Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // *Plant Cell Environ.* 2000. V. 23. P. 337.
5. Ma S., Lin C., Chen Y. Comparative studies of chilling stress on alterations of chloroplast ultrastructure and protein synthesis in the leaves of chilling-sensitive (mung bean) and insensitive (pea) seedlings // *Bot. Bull. Acad. Sin.* 1990. V. 31. P. 263.
6. Deryabin A.N., Sinkevich M.S., Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. CO<sub>2</sub> exchange and structural organization of chloroplasts under hypothermia in potato plants transformed with a gene for yeast invertase // *Russ. J. Plant Physiol.* 2007. V. 54. P. 450. <https://doi.org/10.1134/S1021443707040036>
7. Трунова Т.И., Астахова Н.В. Роль ультраструктуры клеток в формировании морозостойкости озимой пшеницы // Докл. АН. 1998. Т. 359. С. 120.

8. Popov V.N., Antipina O.V., Astakhova N.V. Changes in chloroplast ultrastructure of tobacco plants in the course of protection from oxidative stress under hypothermia // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 301. <https://doi.org/10.1134/S1021443716030110>
9. Smillie R.M., Critchley C., Bain J.M., Nott R. Effect of growth temperature on chloroplast structure and activity in barley // Plant Physiol. 1978. V. 62. P. 191.
10. Venzhik Y.V., Titov A.F., Talanova V.V., Miroslavov E.A., Koteeva N.K. Structural and functional reorganization of the photosynthetic apparatus in adaptation to cold of wheat plants // Cell Tissue Biol. 2013. V. 7. P. 168. <https://doi.org/10.1134/S1990519X13020132>
11. Pribil M., Labs M., Leister D. Structure and dynamics of thylakoids in land plants // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 1955. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru090>
12. Wijk K.J., Kessler F. Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation // Annu. Rev. Plant Biol. 2017. V. 68. P. 253. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111737>
13. Климов С.В., Астахова Н.В., Трунова Т.И. Сопряженные изменения морозостойкости, фотосинтеза и дыхания, ультраструктуры клеток и хлоропластов у озимой пшеницы и ржи при холодовом закаливании // Докл. АН. 1994. Т. 337. С. 276.
14. Wise R.R., McWilliam J., Naylor A.W. A comparative study of low-temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities // Plant Cell Environ. 1983. V. 6. P. 525.
15. Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. Relationship between plant cold tolerance, photosynthesis and ultrastructural modifications of cells and chloroplasts // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 44. P. 759.
16. Vella N.G.F., Joss T.V., Roberts T.H. Chilling induced ultrastructural changes to mesophyll cells of *Arabidopsis* grown under short days are almost completely reversible by plant re-warming // Protoplasma. 2012. V. 249. P. 1137. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0363-5>
17. Nagler M., Nukarinen E., Weckwerth W., Nägele T. Integrative molecular profiling indicates a central role of transitory starch breakdown in establishing a stable C/N homeostasis during cold acclimation in two natural accessions of *Arabidopsis thaliana* // BMC Plant Biol. 2015. V. 15. Article 284. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0668-1>
18. Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.C., Nunes M.A. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. Plants // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 283. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833>
19. Трунова Т.И., Астахова Н.В., Дерябин А.Н., Сабельникова Е.П. Ультраструктурная организация хлоропластов листьев растений картофеля, трансформированного геном дрожжевой инвертазы, в норме и при гипотермии // Докл. АН. 2003. Т. 389. С. 842.
20. Климов С.В. Холодовое закаливание растений – результат поддержания повышенного отношения фотосинтез/дыхание при низких температурах // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. Т. 30. С. 57.
21. Туркина М.В., Соколова С.В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука. 1971. С. 7.
22. Zuther E., Schulz E., Childs L.H., Hincha D.K. Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. P. 1860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02522.x>
23. Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. Changes in Photosynthesis, Dark Respiration Rates and Photosynthetic Carbon Partitioning in Winter Rye and Wheat Seedlings during Cold Hardening // J. Plant Physiol. 1999. V. 155. P. 734.
24. Crosatti C., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Cattivelli L. Harden the chloroplast to protect the plant // Physiol. Plant. 2013. V. 147. P. 55. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01689.x>
25. Du Y.C., Nose A., Wasano K. Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species // Plant Cell Environ. 1999. V. 22. P. 317.
26. 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>
27. Gamalei Y.V., Pakhomova M.V., Sjutkina A.V. Ecological aspects of assimilate export. Temperature // Fiziol. Rast. 1992. V. 39. P. 1068.
28. Климов С.В., Дубинина И.М., Бураханова Е.А., Астахова Н.В., Попов В.Н., Алиева Г.П., Трунова Т.И. Связь CO<sub>2</sub>-газообмена с накоплением сахаров и активностью инвертаз при холодовом закаливании озимой пшеницы // Докл. АН. 2004. Т. 398. С. 135.
29. Klimov S.V., Trunova T.I., Mokronosov A.T. Mechanism of plant adaptation to unfavourable environments via changes in source-sink relations // Fiziol. Rast. 1990. V. 37. P. 1024.
30. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник РАН. 2005. Т. 75. С. 338.

## ВОВЛЕЧЕНИЕ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ И ОКСИДА АЗОТА (NO) В РЕАЛИЗАЦИЮ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ДОНОРА МОНООКСИДА УГЛЕРОДА (CO) НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ

© 2021 г. М. А. Шкляревский<sup>а</sup>, Ю. Е. Колупаев<sup>а, \*</sup>, Ю. В. Карпец<sup>а</sup>,  
А. А. Луговая<sup>а</sup>, В. П. Бессонова<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина

<sup>б</sup>Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, Днепр, Украина

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

Поступила в редакцию 05.11.2020 г.

После доработки 16.11.2020 г.

Принята к публикации 17.11.2020 г.

Исследовали участие оксида азота (NO) и его связь с другими сигнальными посредниками при индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) донором монооксида углерода (CO) гемином. Показано, что обработка гемином (5 мкМ), повышающая теплоустойчивость, приводит к транзиторному, почти двукратному, увеличению содержания NO и активности нитратредуктазы (НР) в корнях. Максимальное повышение этих показателей отмечалось через 1 ч после начала инкубации проростков на среде, содержащей гемин. Подъем содержания оксида азота в корнях устранялся под влиянием ингибитора нитратредуктазы вольфрамата натрия, но не ингибитора NO-синтазы и диаминооксидазы аминогуанидина. Также активации НР и повышению содержания NO в корнях препятствовала обработка корней хелатором внеклеточного кальция ЭГТА и ингибитором поступления кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов неомицином. В то же время при обработке проростков антиоксидантом диметилтиомочевинной (ДМТМ) вызываемые донором CO эффекты повышения активности НР и содержания NO полностью сохранялись. Внесение в среду инкубации проростков скавенджера NO РТЮ (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide) и ингибитора НР вольфрамата натрия нивелировало повышение активности внеклеточной пероксидазы и содержания пероксида водорода в корнях, происходящее при обработке гемином. После повреждающего прогрева при 45°C под влиянием донора CO снижалось проявление окислительного стресса, определяемое по содержанию продукта ПОЛ малонового диальдегида, и повышалось выживание проростков. Эти эффекты гемина устранялись при обработке проростков скавенджерами NO (РТЮ) и пероксида водорода (ДМТМ), ингибитором НР вольфраматом натрия и антагонистами кальция ЭГТА и неомицином. Сделано заключение, что в передаче сигнала экзогенного CO принимает участие NO, образующийся с участием НР. Повышение содержания NO активирует образование АФК, также задействованных в реализации стресс-протекторных эффектов монооксида углерода. При этом вызываемое CO усиление генерации NO клетками корней и развитие теплоустойчивости проростков зависят от кальциевого гомеостаза.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, монооксид углерода, гемин, теплоустойчивость, оксид азота, нитратредуктаза, пероксид водорода, кальций

DOI: 10.31857/S0015330321040163

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы интенсивно накапливаются сведения о роли газотрансмиттеров — эндогенных газообразных сигнальных молекул — в физиологических процессах у растений [1]. К основным

газотрансмиттерам относят монооксид углерода (CO), оксид азота (NO) и сероводород (H<sub>2</sub>S) [2]. Для газотрансмиттеров растительных клеток характерно отсутствие конкретных рецепторов, наличие общих мишеней и многоуровневое функциональное взаимодействие друг с другом и фитогормонами [2–4].

Роль монооксида углерода в жизни растений до сих пор остается малоизученной. Одной из важных его функций является участие в форми-

**Сокращения:** L-NAME — N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, РТЮ — 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide, ДМТМ — диметилтиомочевина, НР — нитратредуктаза, ПО — пероксидаза.

ровании адаптивных реакций на действие стрессоров различной природы. Увеличение эндогенного содержания CO в клетках растений зарегистрировано в ответ на обезвоживание [5], действие натрий-хлоридного засоления [6], низких [7] и высоких [8] температур. Получены данные о повышении устойчивости к стрессорам растений разных таксономических групп под влиянием газообразного CO или его доноров – гемина и гематина [5, 9]. Эти соединения являются искусственными субстратами гемоксигеназы, образующей CO в результате окислительной дегградации гема [10].

Несмотря на накопленный довольно широкий спектр феноменологических данных о влиянии CO на устойчивость растений, механизмы таких эффектов остаются малоизученными. В частности, открытым остается вопрос о роли других компонентов сигнальной сети в реализации стресс-протекторного действия монооксида углерода [10]. Одним из них является другой газотрансммиттер – оксид азота. Показано, что обработка проростков пшеницы гематином вызывала повышение содержания NO [5]. При этом сквенджер NO PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) устранял повышение устойчивости проростков к осмотическому стрессу (действию ПЭГ 6000), вызываемое донором CO [5]. Эффекты увеличения эндогенного содержания NO зарегистрированы и при обработке проростков пшеницы раствором газообразного CO, которая вызывала повышение солеустойчивости [11]. Также показано, что индуцируемый гематином эффект закрывания устьиц у бобов сопровождался повышением содержания NO в замыкающих клетках и устранялся его сквенджером PTIO и ингибитором NO-синтазы L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester) [12]. Однако сведения о роли NO в реализации стресс-протекторного действия монооксида углерода на растения пока получены лишь в единичных исследованиях. При этом остается открытым вопрос о вкладе различных путей синтеза NO в увеличение его содержания под действием экзогенного CO на растительные объекты.

Известно, что NO как сигнальная молекула находится в тесном функциональном взаимодействии с активными формами кислорода (АФК) и ионами кальция [13]. Имеются немногочисленные данные, указывающие на роль АФК и  $Ca^{2+}$  в реализации устьичных и ростовых эффектов монооксида углерода [14, 15]. Недавно мы показали участие пероксида водорода, генерируемого внеклеточной пероксидазой (ПО), а также цитозольного кальция, в индуцировании донором CO геминном антиоксидантной системы проростков пшеницы и их теплоустойчивости [16, 17]. При этом роль NO и возможных функциональных связей между оксидом азота, АФК и ионами кальция в процессе

индуцирования теплоустойчивости клеток растений экзогенным CO оставалась неизученной.

Цель настоящей работы состояла в исследовании возможного участия оксида азота и генерирующих его ферментативных систем в регуляции образования АФК и индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы действием донора CO гемина. Также в работе была изучена зависимость влияния донора монооксида углерода на генерацию NO клетками корней от их кальциевого статуса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 4-суточные (на момент начала эксперимента) этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала. Зерновки обеззараживали 6% пероксидом водорода в течение 30 мин и проращивали 4 сут при температуре 18–20°C на водопроводной воде, очищенной с использованием системы водоподготовки, включающей в себя фильтр механической очистки, угольный фильтр и полупроницаемую обратносомотическую мембрану с размером ячеек 1 нм. В среду инкубации корней добавляли гемин производства Sigma-Aldrich (в конечной концентрации 5 мкМ) и выдерживали проростки в течение 24 ч. Условия обработки и оптимальная концентрация гемина, при которой отмечалось максимальное повышение теплоустойчивости проростков, были выбраны ранее [16]. Также в предыдущей работе была подтверждена связь изучаемых на примере интактных корней проростков пшеницы эффектов гемина с образованием CO [16].

При изучении влияния сквенджера NO PTIO (0.1 мМ), ингибитора нитратредуктазы вольфрамата натрия (2 мМ) [13], ингибитора NO-синтазы и диаминооксидазы амингуанидина (1 мМ) [18], сквенджера пероксида водорода диметилтиомочевина (ДМТМ, 0.150 мМ) [19], а также хелатора внеклеточного кальция ЭГТА (0.5 мМ) и ингибитора образования инозитол-1,4,5-фосфата неомидина (0.2 мМ) [17] инкубация корней в растворах составляла 26 ч. При оценке комбинированного действия гемина и антагонистов сигнальных посредников последние добавляли в среду инкубации корней за 2 ч до введения в нее гемина. Концентрации указанных соединений выбирали в предварительных опытах.

Биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чувствительны к воздействиям экзогенных соединений и теплового стресса [19]. Во время инкубации проростков на растворах исследуемых соединений определяли содержание в корнях оксида азота и пероксида водорода, активность нитратредуктазы (НР) и внеклеточной ПО, после стрессового воздействия также оценивали содержание продукта

перекисного окисления липидов (ПОЛ) малонового диальдегида (МДА).

По окончании инкубации на растворах гемина и исследуемых ингибиторов проростки подвергали повреждающему прогреву в водяном ультратермостате при температуре 45°C в течение 10 мин [16]. В дальнейшем их переносили на очищенную водопроводную воду и выращивали в течение трех суток при температуре около 20°C и освещении 6000 лк для оценки выживания. После этого оценивали относительное количество выживших проростков. К таковым относили проростки, которые не имели выраженных признаков некроза на листьях и сохраняли способность к росту.

Содержание NO в корнях определяли по методу, описанному Zhou с соавт. [20], с некоторыми модификациями. В основе метода – превращение содержащегося в растениях NO в нитрит и определение концентрации последнего по реакции Грисса. Навеску свежевырезанного растительного материала гомогенизировали на льду в 50 мМ ацетатном буфере (рН 3.6) с добавлением 2%-го ацетата цинка. Гомогенат центрифугировали на центрифуге MPW 350R (“MPW MedInstruments”, Польша) при температуре 2–4°C при 8000 г в течение 15 мин, затем к 10 мл супернатанта добавляли 250 мг древесного угля. Смесь фильтровали через бумажный фильтр, после чего смешивали 2 мл фильтрата с 1 мл 1%-го реактива Грисса в 12%-й уксусной кислоте. Через 30 мин определяли светопоглощение раствора на спектрофотометре СФ 46 (“ЛОМО”, Россия) при длине волны 530 нм. В качестве стандарта использовали растворы нитрита натрия. Содержание NO выражали в нмоль/г сырой массы.

Активность НР (КФ 1.7.1.1) определяли *in vitro* по количеству накопленного продукта реакции нитрита [21]. Корни гомогенизировали на льду в 0.05 М К, Na-фосфатном буфере с рН 7.8, гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 4000 г при температуре 2–4°C. К супернатанту добавляли 0.1 М KNO<sub>3</sub> и 5 мМ НАД·Н. В холостую пробу вместо НАД·Н добавляли дистиллированную воду. Реакцию проводили при 25°C в течение 30 мин, после чего останавливали добавлением ледяной уксусной кислоты. Для осаждения белков пробу центрифугировали 10 мин при 8000 г. К супернатанту добавляли 1%-й реактив Грисса в 12%-й уксусной кислоте. Через 30 мин измеряли оптическую плотность раствора при 527 нм на спектрофотометре СФ 46 (“ЛОМО”, Россия). Активность фермента выражали в нмоль нитрита/(г сырой массы мин).

Для определения содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> корни гомогенизировали на льду в 5%-ной ТХУ. Пробы центрифугировали при 8000 г в течение 10 мин при температуре 2–4°C и в супернатанте определяли концентрацию пероксида водорода с использованием ферроцианидного метода [22].

Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> выражали в нмоль/г сырой массы.

Активность внеклеточной ПО (КФ 1.11.1.7) определяли в корнях проростков, как описано в работе [23] с модификациями. Корни исследуемых интактных проростков помещали в стаканчики с дистиллированной водой, рН которой доводили до 6.2 с помощью NaOH. Через 20 мин проростки извлекали, корни отсекали, обсушивали фильтровальной бумагой и взвешивали, а в инкубационной среде определяли активность фермента по реакции окисления гваякола пероксидом водорода [17]. Активность фермента выражали в мкмоль гваякола/(г сырой массы мин).

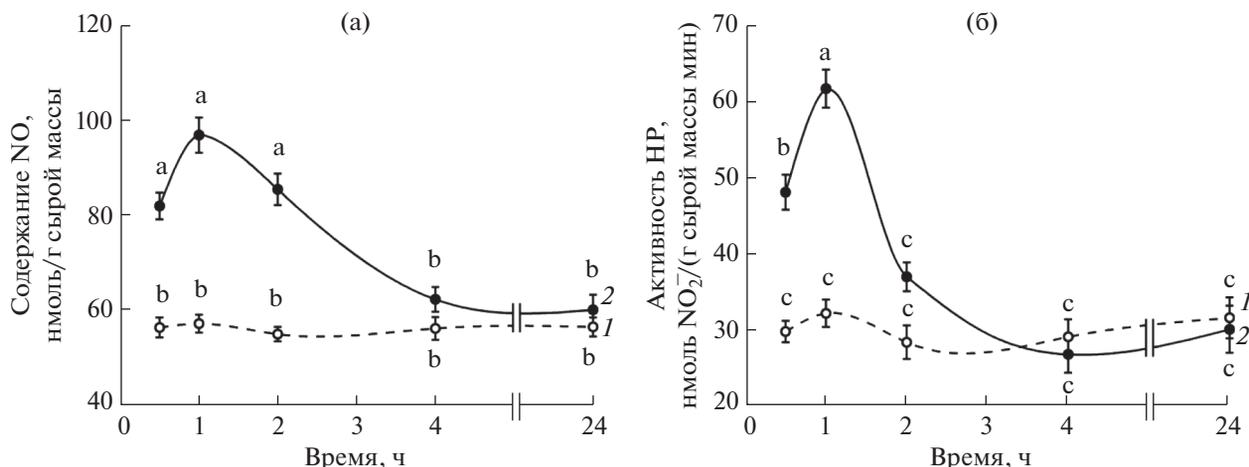
Для определения продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (преимущественно МДА), корни гомогенизировали в реакционной среде, содержащей 0.25%-ю 2-тиобарбитуровую кислоту в 10%-й ТХУ, гомогенат помещали в кипящую баню на 30 мин. Затем пробы резко охлаждали и центрифугировали 15 мин при 10000 г. Оптическую плотность надосадочной жидкости определяли при 532 нм (максимум светопоглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое светопоглощение) [24].

Эксперименты проводили в 4-кратной биологической повторности и каждый независимо воспроизводили не менее 3 раз. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Достоверность различий при  $P \leq 0.05$  определяли с использованием дисперсионного анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Содержание NO и активность НР в корнях проростков при действии гемина.** Содержание оксида азота в корнях контрольного варианта в течение 24 ч наблюдений существенно не изменялось (рис. 1а). Внесение в среду инкубации проростков пшеницы гемина уже через 0.5 ч вызывало значительное повышение в них содержания оксида азота. Через 1 ч после начала обработки донором СО наблюдалось максимальное увеличение количества NO в корнях проростков опытного варианта. Повышенный уровень оксида азота в корнях сохранялся и через 2 ч после начала воздействия гемина, однако уже через 4 ч его содержание в варианте с донором NO не отличалось от контроля, не было существенных различий между вариантами и через 24 ч после начала воздействия гемина (рис. 1а).

Активность НР в корнях в контроле за 24 ч наблюдений существенно не изменялась (рис. 1б). При обработке геминном ее динамика во многом была похожей на динамику содержания NO: увеличение начиналось через 0.5 ч от начала экспозиции, максимум наблюдался через 1 ч действия донора СО, после чего активность НР в корнях



**Рис. 1.** Динамика содержания оксида азота (а) и активности нитратредуктазы (б) в корнях проростков пшеницы при действии гемина. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ .

проростков опытного варианта не отличалась от контроля (рис. 1б).

**Влияние модуляторов на индуцированное геминном увеличении содержания NO и активности НР в корнях проростков.** В последующих экспериментах выясняли, какие ферментативные системы причастны к вызываемому экзогенным СО увеличению содержания NO в корнях. Сами по себе вольфрамат натрия и аминоксидин достоверно не влияли на его количество в корнях, хотя и вызывали тенденцию к уменьшению его содержания (рис. 2а). При действии гемина в комбинации с ингибитором НР вольфраматом натрия влияние донора СО на содержание NO не проявлялось. Ингибитор НР вольфрамат натрия вызывал снижение активности фермента в корнях и устранял вызываемый донором СО эффект увеличения активности НР (рис. 2б). В то же время обработка проростков ингибитором NO-синтазы и диаминооксидазы аминоксидином практически не препятствовала увеличению содержания NO, происходящему под влиянием гемина (рис. 2а). Таким образом, данные ингибиторного анализа и прямого определения активности НР указывают на значительный вклад именно этого фермента в эффект усиления генерации оксида азота клетками корней при действии донора СО.

Обработка проростков антиоксидантом ДМТМ не влияла на содержание в них NO и не снимала эффект увеличения содержания оксида азота при инкубации в среде с геминном (рис. 2а). Не оказывал сквенджер пероксида водорода ДМТМ влияния и на активность НР в корнях проростков как в отсутствие, так и в присутствии донора монооксида углерода (рис. 2б).

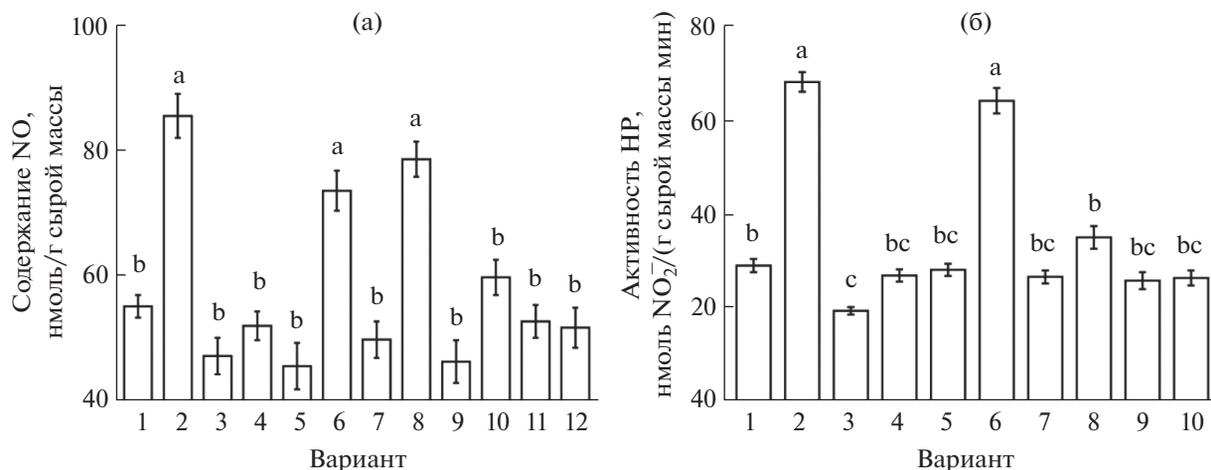
Антагонисты кальция ЭГТА и неомицин достоверно не влияли на содержание NO и активность НР в корнях. При этом они полностью устраняли эффекты повышения количества NO и активности

НР в ответ на внесение в среду инкубации проростков донора СО гемина (рис. 2).

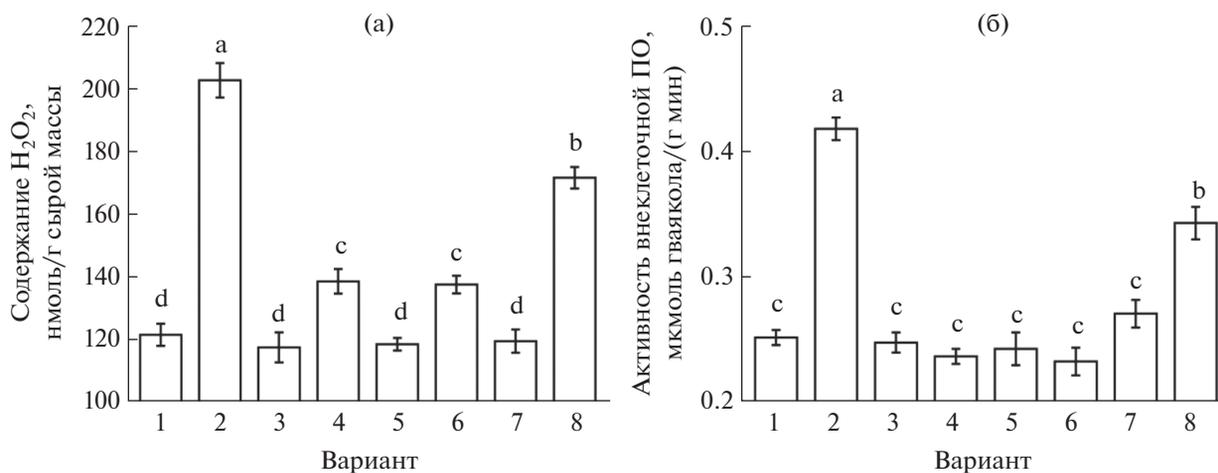
**Содержание пероксида водорода и активность внеклеточной ПО в корнях при действии гемина и антагонистов оксида азота.** Ранее в идентичных экспериментальных условиях было установлено, что добавление 5 мкМ гемина в среду инкубации корней проростков вызывало в них увеличение содержания пероксида водорода и активности внеклеточной ПО с максимумами через 2 и 1.5 ч соответственно [16]. В связи с этим, именно в таких временных точках оценивали влияние сквенджера NO РТЮ и ингибиторов ферментов синтеза оксида азота на количество H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и активность внеклеточной ПО в корнях. Установлено, что обработка РТЮ сама по себе почти не влияла на содержание пероксида водорода и активность фермента (рис. 3). При этом под влиянием сквенджера оксида азота полностью устранялось вызываемое обработкой геминном повышение активности внеклеточной ПО и значительно нивелировалось увеличение содержания пероксида водорода в корнях.

При обработке ингибитором НР вольфраматом натрия содержание пероксида водорода и активность внеклеточной ПО в корнях не изменялись (рис. 3). В то же время этот ингибитор полностью устранял эффекты повышения содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и активности внеклеточной ПО, вызываемые действием донора СО.

Обработка корней проростков аминоксидином, ингибирующим NO-синтазу и диаминооксидазу, существенно не влияла на содержание в них пероксида водорода и активности внеклеточной ПО. При этом аминоксидин лишь немного уменьшал проявление эффектов повышения содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и активности внеклеточной ПО в корнях, которые происходили при обработке геминном (рис. 3).



**Рис. 2.** Содержание NO (а) и активность НР (б) в корнях проростков пшеницы при обработке геминном и антагонистами оксида азота, АФК и кальция. (а): 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – вольфрамат натрия (2 мМ); 4 – гемин (5 мкМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); 5 – аминоксантидин (1 мМ); 6 – гемин (5 мкМ) + аминоксантидин (1 мМ); 7 – ДМТМ (0.15 мМ); 8 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (0.15 мМ); 9 – ЭГТА (0.5 мМ); 10 – гемин (5 мкМ) + ЭГТА (0.5 мМ); 11 – неомицин (0.2 мМ); 12 – гемин (5 мкМ) + неомицин (0.2 мМ). (б): 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – вольфрамат натрия (2 мМ); 4 – гемин (5 мкМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); 5 – ДМТМ (0.15 мМ); 6 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (0.15 мМ); 7 – ЭГТА (0.5 мМ); 8 – гемин (5 мкМ) + ЭГТА (0.5 мМ); 9 – неомицин (0.2 мМ); 10 – гемин (5 мкМ) + неомицин (0.2 мМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ . Примечание. Содержание NO и активность НР в корнях определяли через 1 ч после начала обработки геминном и/или через 3 ч от начала обработки другими соединениями.

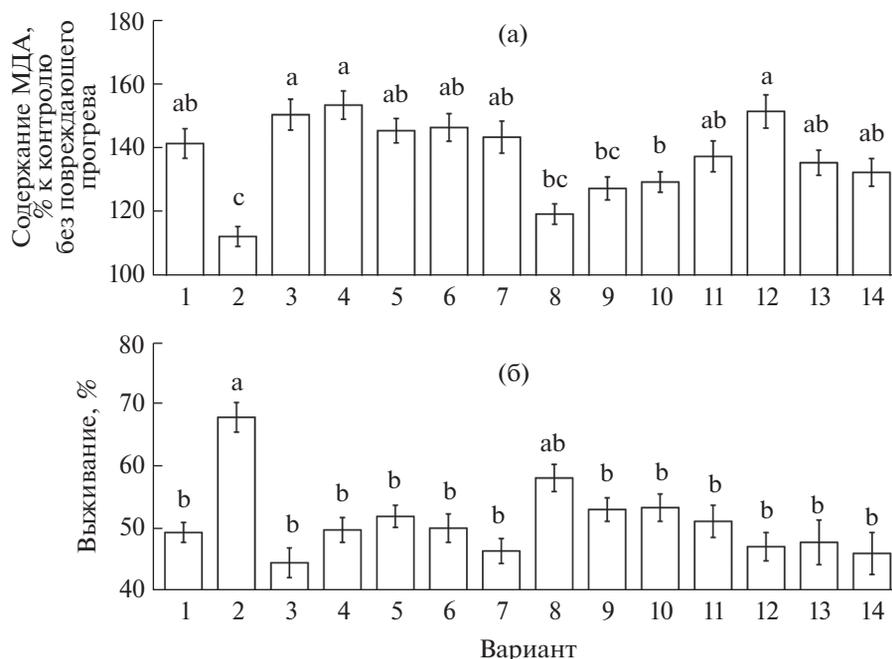


**Рис. 3.** Содержание пероксида водорода (а) и активность внеклеточной ПО (б) в корнях проростков пшеницы при обработке геминном и антагонистами оксида азота. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – РТЮ (0.1 мМ); 4 – гемин (5 мкМ) + РТЮ (0.1 мМ); 5 – вольфрамат натрия (2 мМ); 6 – гемин (5 мкМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); 7 – аминоксантидин (1 мМ); 8 – гемин (5 мкМ) + аминоксантидин (1 мМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ . Примечание. Содержание пероксида водорода в корнях определяли через 2 ч после начала обработки геминном и/или через 4 ч от начала обработки другими соединениями, активность внеклеточной ПО анализировали через 1.5 ч после начала действия гемина и/или через 3.5 ч после начала обработки другими соединениями.

**Влияние модуляторов NO-, АФК и кальциевого гомеостаза на проявление стресс-протекторного действия на проростки донора СО при гипертермии.** Через сутки после повреждающего прогрева содержание продукта ПОЛ МДА в корнях проростков в контрольном варианте увеличивалось более чем на 40% (рис. 4а). Обработка проростков гемин-

ном значительно уменьшала окислительные повреждения, о чем свидетельствует лишь небольшое повышение содержания МДА в корнях проростков соответствующего варианта.

При обработке проростков скавенджером NO РТЮ интенсивность процессов ПОЛ, индуцируемых тепловым стрессом, изменялась незначитель-



**Рис. 4.** Содержание МДА в корнях (а) и выживание проростков пшеницы (б) после повреждающего прогрева. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – РТЮ (0.1 мМ); 4 – гемин (5 мкМ) + РТЮ (0.1 мМ); 5 – вольфрамат натрия (2 мМ); 6 – гемин (5 мкМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); 7 – аминокуанидин (1 мМ); 8 – гемин (5 мкМ) + аминокуанидин (1 мМ); 9 – ДМТМ (0.15 мМ); 10 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (0.15 мМ); 11 – ЭГТА (0.5 мМ); 12 – гемин (5 мкМ) + ЭГТА (0.5 мМ); 13 – неомицин (0.2 мМ); 14 – гемин (5 мкМ) + неомицин (0.2 мМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ . Примечание. Содержание МДА определяли через 24 ч, выживание проростков – через 3 сут после повреждающего прогрева.

но. При этом РТЮ полностью устранял проявление антиоксидантного действия гемина (рис. 4а). Ингибитор НР вольфрамат натрия сам по себе не оказывал влияния на вызываемое тепловым стрессом накопление продуктов ПОЛ в корнях проростков, однако, как и РТЮ, снимал эффект смягчения окислительного стресса, вызываемый обработкой проростков донором СО.

При обработке проростков аминокуанидином, который ингибирует NO-синтазу и диаминооксидазу, содержание МДА в корнях проростков, подвергнутых действию гипертермии, не отличалось от контроля. При этом данный ингибитор лишь немного ослаблял проявление антиоксидантного действия обработки проростков геминем (рис. 4а).

Обработка проростков скавенджером пероксида водорода ДМТМ несколько уменьшала проявление влияния гипертермии на содержание МДА, но при этом она частично нивелировала антиоксидантное действие донора СО (рис. 4а).

Антагонисты кальция ЭГТА и неомицин сами по себе слабо влияли на содержание МДА в корнях проростков пшеницы после действия гипертермии. В то же время ЭГТА устранял, а неомицин заметно уменьшал проявление эффекта смягчения процессов ПОЛ, вызываемого действием гемина (рис. 4а).

Обработка проростков донором СО значительно повышала их выживание после повреждающего прогрева (рис. 4б). Различные антагонисты NO (РТЮ, вольфрамат натрия, аминокуанидин) не оказывали достоверного влияния на теплоустойчивость проростков. Однако скавенджер NO и ингибитор НР полностью устраняли защитное действие донора СО на проростки при гипертермии. В то же время аминокуанидин лишь частично уменьшал положительное влияние обработки геминем на выживание проростков после повреждающего прогрева.

Антиоксидант ДМТМ существенно не влиял на выживание проростков после теплового стресса, но устранял положительное влияние донора СО на их теплоустойчивость. Антагонисты кальция ЭГТА и неомицин сами по себе также не влияли на относительную величину выживания проростков после теплового стресса, но при этом полностью нивелировали повышение теплоустойчивости проростков, вызываемое обработкой геминем (рис. 4б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о роли оксида азота в реализации стресс-протекторного действия экзогенного СО на проростки пшеницы при гипертермии. На это, в частности, указывает транзиторное повышение содержания NO в кор-

нях проростков пшеницы в течение первых двух часов их инкубации на среде с донором СО гемином (рис. 1а). Такие результаты согласуются с данными Liu и соавт. [5], показавших увеличение содержания NO в семенах пшеницы, прорастание которых в условиях осмотического стресса стимулировалось действием гематина. Также зарегистрировано повышение содержания NO в корнях проростков пшеницы при действии водного раствора газообразного СО, которое индуцировало развитие их устойчивости к солевому стрессу [11]. Следует однако отметить, что в указанных работах повышение содержания NO в клетках зарегистрировано при продолжительном воздействии экзогенного СО (12–24 ч). На нашей модели показано достаточно быстрое и транзитное повышение содержания NO, что характерно для его сигнальных эффектов [1].

В задачи нашей работы также входило выяснение возможных ферментативных путей синтеза NO в клетках корней под влиянием донора монооксида углерода. Как известно, NO у растений может образовываться по восстановительным или по окислительным путям [2, 25]. Восстановительный путь предполагает использование в качестве субстратов нитрата или нитрита в реакциях, катализируемых нитратредуктазой, связанной с плазматической мембраной нитрит-NO-редуктазой и локализованной в пероксисомах ксантиноксидоредуктазой [2]. Механизм образования оксида азота окислительным путем из L-аргинина у растений до сих пор остается предметом дискуссии, поскольку гомологи NO-синтазы животных обнаружены только у зеленых водорослей. В настоящее время считается, что наземные растения не имеют типичной NO-синтазы животных. Предполагают, что во время эволюции произошла потеря этого гена [26]. Однако не исключено, что у высших растений в пероксисомах имеются белки, отличные от NO-синтазы, но способные генерировать NO, используя L-аргинин в качестве субстрата. Эта реакция, как и катализируемая NO-синтазой животных, может происходить при наличии НАДФ·Н, ФМН, ФАД, кальмодулина и ионов кальция [25]. В качестве основных субстратов для образования NO в окислительном пути в последнее время рассматривают не только L-аргинин, но и полиамины, превращения которых катализируются ди- и полиаминоксидазами [2, 25].

В наших экспериментах показано отсутствие заметного влияния аминогуанидина, ингибирующего как NO-синтазу, так и диаминоксидазу, на вызываемое донором СО увеличение содержания оксида азота в корнях проростков пшеницы (рис. 2а). Это указывает на то, что окислительный путь практически не вовлекается в стимулируемый экзогенным СО синтез оксида азота в корнях проростков. В то же время при обработке проростков гемином отмечалось транзитное по-

вышение активности НР, которое по времени совпадало с эффектом увеличения содержания NO (рис. 2). Следует заметить, что активность НР в корнях в условиях наших экспериментов была довольно низкой, что связано с инкубированием проростков в отсутствие экзогенных нитратов. Однако эти результаты согласуются с полученными ранее данными о наличии активности НР в органах проростков пшеницы при их выращивании в течение нескольких дней на безнитратной среде [21]. Наши эксперименты показали, что ингибирование активности НР вольфраматом натрия устраняло эффект повышения содержания оксида азота в корнях, вызываемый донором СО (рис. 2). Таким образом, по-видимому, НР является основным ферментом, обеспечивающим генерацию оксида азота в клетках корней при действии донора СО. Похожие результаты получены Bai с соавт. при стимулировании растворами СО или гемина прорастания семян *Baccaurea ramiflora* при низких температурах. Под влиянием экзогенного СО повышалось содержание NO в зародышах. Такой эффект устранялся ингибитором НР вольфраматом натрия, но не ингибитором NO-синтазы L-NAME [7]. С другой стороны, в работе Xie с соавт. [11] показано устранение ингибитором NO-синтазы L-NAME вызываемого экзогенным СО повышения содержания NO в корнях проростков пшеницы, подвергнутых солевому стрессу. Не исключено, что в зависимости от природы стрессоров и других экспериментальных условий в ответ на действие СО могут активироваться различные пути синтеза NO.

Наблюдаемые в наших экспериментах эффекты увеличения активности НР и содержания NO в корнях проростков, обработанных донором СО, оказались зависимыми от кальциевого гомеостаза. Они подавлялись как хелатором внеклеточного кальция ЭГТА, так и неомицином – ингибитором образования инозитол-1,4,5-фосфата, способного открывать внутриклеточные кальциевые каналы (рис. 2). Эффект активации растительной НР ионами кальция и ингибирования в присутствии хелатора кальция в условиях *in vitro* показан достаточно давно [27]. Также обнаружено повышение активности НР в интактных растениях под влиянием экзогенного кальция [28]. Вероятно, регуляция активности НР монооксидом углерода опосредована кальцием. В целом, участие кальция в реализации физиологических эффектов СО изучено очень слабо, хотя сообщается о его роли в проявлении ростовых эффектов монооксида углерода [14]. В наших экспериментах вызываемое обработкой гемином повышение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, гваяколпероксидазы) в корнях проростков пшеницы не проявлялось в присутствии ЭГТА и неомицина [17].

Еще одним посредником в сигнальных цепях, индуцируемых монооксидом углерода, является пероксид водорода [16]. Возможная связь между NO и АФК как участниками сигнальных процессов, инициируемых СО, на растительных объектах до сих пор почти не исследована. Из результатов наших экспериментов следует, что в сигнальной цепи, стимулируемой монооксидом углерода, NO находится выше пероксида водорода. На это указывают более быстрое образование NO в корнях пшеницы при обработке гемином (максимальный эффект через 1 ч) (рис. 1а) по сравнению с динамикой изменения содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (максимум через 2 ч) [16], а также результаты ингибиторного анализа. Так, предобработка проростков пшеницы скавенджером NO РТЮ и ингибитором НР вольфраматом натрия устраняла вызываемые гемином эффекты увеличения в корнях проростков активности внеклеточной ПО и содержания пероксида водорода (рис. 3). С другой стороны, антиоксидант ДМТМ не влиял на вызываемое донором СО увеличение активности НР и содержания оксида азота в корнях (рис. 2). Можно полагать, что стимулируемое донором СО повышение содержания NO вызывает последующую активацию внеклеточной ПО, которая может катализировать образование АФК [29], в том числе в корнях [23]. В литературе имеются данные о повышении активности различных пероксидаз под влиянием доноров NO [30]. Не исключено, что такие эффекты могут быть обусловлены взаимодействием NO с гемом, входящим в состав активных центров этих ферментов. Естественно, что для определенных выводов о механизмах вызываемой донором СО и опосредованной NO активации внеклеточной ПО необходимы специальные исследования.

Оценка влияния модуляторов сигнальных процессов на интегральные физиологические показатели, характеризующие устойчивость — интенсивность ПОЛ и выживание проростков после повреждающего прогрева — также свидетельствует о вовлечении NO, АФК и ионов кальция в реализацию стресс-протекторных эффектов донора СО. Так, обработка РТЮ устраняла как вызываемое донором СО смягчение эффекта окислительного стресса, так и происходящее под его влиянием повышение выживания проростков (рис. 4). Таким же образом снимала стресс-протекторные эффекты экзогенного СО и обработка проростков ингибитором НР вольфраматом натрия. В то же время аминогуанидин, ингибирующий ферменты окислительного пути образования NO, не оказывал влияния на его содержание при действии на проростки гемина и лишь незначительно уменьшал эффекты смягчения донором СО окислительного стресса (рис. 4а) и повышения выживания проростков после повреждающего прогрева (рис. 4б).

ДМТМ, обладающая антиоксидантными свойствами, сама по себе немного снижала вызываемое

прогревом накопление МДА в корнях проростков, однако этот модулятор частично уменьшал вызываемый донором СО эффект смягчения окислительного стресса и полностью устранял его положительное влияние на теплоустойчивость (рис. 4). Эти данные подтверждают сделанное ранее заключение о роли пероксида водорода в реализации стресс-протекторного действия экзогенного монооксида углерода на проростки при гипертермии [16].

Антагонисты кальция (хелатор внеклеточного Ca<sup>2+</sup> ЭГТА и ингибитор поступления кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов неомидин), как и скавенджер пероксида водорода ДМТМ и антагонисты NO (РТЮ и вольфрамат натрия), устраняли эффект предотвращения развития окислительного стресса донором СО и полностью снимали его положительное влияние на выживание проростков после прогрева (рис. 4).

В целом устранение антагонистами NO повышения содержания в корнях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, вызываемого экзогенным СО, а также более динамичное изменение содержания оксида азота по сравнению с пероксидом водорода, указывает на то, что NO в сигнальном пути расположен выше, чем H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В свою очередь ингибирование вызываемого донором СО накопления NO в клетках корней кальциевыми антагонистами ЭГТА и неомидином позволяет предполагать, что запуск сигнального пути, связанного с активацией НР, увеличением содержания NO и последующим накоплением пероксида водорода, включает в себя изменение кальциевого гомеостаза. При этом, вероятно, поступление кальция в цитозоль из внеклеточного пространства и внутренних компартментов стимулирует образование NO и АФК. Безусловно, это предположение требует изучения вызываемых СО изменений кальциевого гомеостаза прямыми методами с определением его концентрации в цитозоле в реальном времени. Тем не менее, полученные в настоящей работе данные позволяют сделать достаточно однозначное заключение о вовлечении NO, образуемого под действием НР, в формирование АФК-сигнала и реализацию стресс-протекторного действия донора СО гемина на проростки пшеницы при гипертермии.

Авторы благодарны за поддержку проекту Czech Republic Development Cooperation “Платформа AgriSciences для развития науки в высших учебных заведениях Украины”, который позволил начать это исследование.

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. Yao Y., Yang Y., Li C., Huang D., Zhang J., Wang C., Li W., Wang N., Deng Y., Liao W. Research progress on the

- functions of gasotransmitters in plant responses to abiotic stresses // *Plants* (Basel). 2019. V. 8 (12): 605. <https://doi.org/10.3390/plants8120605>
2. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschasniy S.P., Dmitriev A.P. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells // *Cytol. Genet.* 2019. V. 53. P. 392.
  3. Maslennikova D.R., Allagulova Ch.R., Fedorova K.A., Plotnikov A.A., Avalbaev A.M., Shakirova F.M. Cytokins contribute to realization of nitric oxide growth-stimulating and protective effects on wheat plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 665.
  4. Hancock J.T. Hydrogen sulfide and environmental stresses // *Environ. Exp. Bot.* 2019. V. 161. P. 50.
  5. Liu Y., Xu S., Ling T., Xu L., Shen W. Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 1371.
  6. Verma K., Dixit S., Shekhawat G.S., Alam A. Antioxidant activity of heme oxygenase 1 in *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian mustard) under salt stress // *Turk. J. Biol.* 2015. V. 39. P. 540.
  7. 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.
  8. 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: 188.
  9. 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.
  10. Mukherjee S., Corpas F.J. Crosstalk among hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Oboznyi A.I. Induction of heat resistance in wheat seedlings by exogenous calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide donor: functional interaction of signal mediators // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 490.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. Shkliarevskiy M.A., Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P. Calcium-dependent changes in cellular redox homeostasis and heat resistance of wheat plantlets under the influence of hemin (carbon monoxide donor) // *Cytol. Genet.* 2020. V. 54. P. 522.
  18. Glyan'ko A.K., Mitanova N.B., Stepanov A.V. Influence of environmental factors on the generation of nitric oxide in the roots of etiolated pea seedlings // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 95.
  19. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Vayner A.A. Functional interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide during formation of wheat seedling induced heat resistance // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 65.
  20. Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis* // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 3223.
  21. Galeeva E.I., Trifonova T.V., Ponomareva A.A., Viktorova L.V., Minibayeva F.V. Nitrate reductase from *Triticum aestivum* leaves: Regulation of activity and possible role in production of nitric oxide // *Biochemistry (Moscow)* 2012. V. 77. P. 404.
  22. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiol.* 1976. V. 57. P. 308.
  23. 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.
  24. Fazlieva E.R., Kiseleva I.S., Zhuikova T.V. Antioxidant activity in the leaves of *Melilotus albus* and *Trifolium medium* from man-made disturbed habitats in the Middle Urals under the influence of copper // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 333.
  25. Gupta K.J., Hancock J.T., Petrivalsky M., Kolbert Z., Lindermayr C., Durner J., Barroso J.B., Palma J.M., Brouquisse R., Wendehenne D., Corpas F.J., Loake G.J. Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research // *New Phytol.* 2020. V. 225. P. 1828.
  26. Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Wong G.K., Wendehenne D. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom // *Sci. Signal.* 2016. V. 9: re2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>
  27. 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.
  28. 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.
  29. 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.
  30. Mataeva A.S., Fomenkov A.A., Nosov A.V., Moshkov I.E., Mur L.A.J., Hall M.A., Novikova G.V. Regulatory role of nitric oxide in plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 427.

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА И САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ГЕНЕРАЦИЮ АФК МИТОХОНДРИЯМИ СЕМЯДОЛЕЙ ЛЮПИНА

© 2021 г. П. А. Буцанец<sup>а</sup>, Н. А. Шугаева<sup>а</sup>, А. Г. Шугаев<sup>а, \*</sup>

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

\*e-mail: ag-shugaev@ifr.moscow

Поступила в редакцию 10.08.2020 г.

После доработки 15.10.2020 г.

Принята к публикации 23.10.2020 г.

Исследовали влияние мелатонина и салициловой кислоты (СК) на дыхание и генерацию АФК (перекиси водорода) при окислении сукцината митохондриями, изолированными из семядолей 5-дневных этиолированных проростков люпина (*Lupinus angustifolius* L.). Показано, что в широком диапазоне концентраций ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  М) мелатонин не оказывал заметного влияния на скорость окисления сукцината в различных метаболических состояниях и величину дыхательного контроля, но в зависимости от концентрации, существенно (до 60% от контроля) ингибировал образование АФК митохондриями, основной вклад в которое вносил комплекс II (сукцинатдегидрогеназа). Присутствие в среде инкубации 0.05–0.5 мМ СК активировало (в 1.5–2.5 раза) образование перекиси водорода при окислении сукцината. При этом СК в низких концентрациях оказывала преимущественно разобщающее (активирующее) действие на окисление сукцината в состоянии 4 (в отсутствие АДФ), а при увеличении ее концентрации наблюдалось ингибирование дыхания в состоянии 3 (в присутствии АДФ). В целом, полученные результаты демонстрируют способность мелатонина и СК оказывать прямое регуляторное действие на генерацию АФК митохондриями, обеспечивая защиту органелл от окислительного стресса, а также способствуя их участию в формировании ответной реакции растений на неблагоприятные условия окружающей среды.

**Ключевые слова:** *Lupinus angustifolius*, семядоли, митохондрии, мелатонин, салициловая кислота, АФК, перекись водорода

DOI: 10.31857/S0015330321040035

### ВВЕДЕНИЕ

Высокая пластичность митохондрий растений, т.е. способность к кардинальным изменениям многих параметров своей структурной организации и функциональной активности в зависимости от изменения внутренних и внешних условий жизнедеятельности растительного организма, хорошо известна [1–3]. В последнее время накапливается все больше доказательств того, что подобная изменчивость митохондрий играет важную роль в адаптации растений к неблагоприятным факторам (НФ) окружающей среды [4, 5]. При этом актуальной задачей становится исследование механизмов регуляции дыхания и редокс-состояния митохондрий в условиях стресса, а также

возможного участия в этом процессе фитогормонов и сигнальных молекул.

Известно, что митохондрии являются одним из центров образования АФК в клетках растений и одновременно одной из наиболее уязвимых мишеней окислительного стресса. В низких концентрациях АФК, прежде всего перекись водорода, выходя из митохондрий, играют важную физиологическую роль в клеточном сигналинге. Однако, при действии НФ (засухи, засоления, экстремальных температур и т.д.) уровень АФК в клетках растений значительно повышается, что может привести к развитию окислительного стресса, следствием чего является повреждение мембран и нарушение нормального функционирования митохондрий [3–5]. Показано, что действие различных НФ вызывает, как правило, неспецифичную защитную реакцию митохондрий, направленную на преодоление избыточной генерации АФК: индукцию процессов свободного окисления (альтернативной оксидазы) и разобщения в ЭТЦ (разобщающих белков), активацию АФК-гасящих фермен-

**Сокращения:** ДК – дыхательный контроль, НФ – неблагоприятные факторы среды, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, СК – салициловая кислота, DCFDA – 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат, DCF – дихлорофлуоресцеин, НР – пероксидаза корней хрена (от *Horseradish Peroxidase*), РТР – пора неспецифической проницаемости во внутренней мембране митохондрий (от *Permeability Transition Pore*).

тов, а также повышение уровня молекулярных антиоксидантов [1, 4, 6, 7].

Среди последних особое внимание в настоящее время уделяется мелатонину, нейрого르몬у животных, который выполняет важную регуляторную роль практически во всех живых организмах, включая растения [8, 9]. Постулируется, что мелатонин может синтезироваться в митохондриях животных и растений, а также транспортироваться в эти органеллы извне и накапливаться в них в достаточно высоких концентрациях [10, 11]. На клетках животных и на изолированных митохондриях показано, что мелатонин, выполняя антиоксидантную функцию, способен нейтрализовать практически все АФК, включая перекись водорода, и, таким образом, защищать клетки и митохондрии от окислительного стресса при патологических состояниях и старении организма [11, 12]. В многочисленных исследованиях было показано, что обработка мелатонином способствовала повышению стресс-устойчивости растений благодаря, в частности, его антиоксидантным свойствам [13]. Вместе с тем влияние мелатонина на метаболическую активность митохондрий растений, включая генерацию АФК, остается практически неизученным.

Среди стрессовых фитогормонов важное регуляторное влияние на метаболическую активность митохондрий растений при действии НФ, включая генерацию АФК, по-видимому, оказывает салициловая кислота (СК) [14]. Известно, что СК, являясь сигнальной молекулой, играет ключевую роль в формировании защитных реакций растений на действие различных биотических и абиотических стресс-факторов [15]. При этом в литературе накапливаются данные, свидетельствующие о том, что митохондрии, а именно образующиеся в них АФК, могут быть вовлечены в передачу сигнала СК при формировании ответной адаптивной реакции растений [16, 17]. В этом процессе могут быть задействованы переносчики электронов дыхательной цепи (комплексы II и III), на АФК-генерирующую активность которых СК оказывает прямое действие [14, 16, 17]. Однако, количество работ, посвященных этому вопросу, остается ограниченным, а представленные в них результаты, в частности по влиянию СК на дыхание и образование АФК митохондриями растений, достаточно противоречивы.

Целью данной работы было изучение влияния мелатонина и СК на дыхательную активность и генерацию АФК (перекиси водорода) митохондриями семядолей люпина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** Объектом исследований служили митохондрии, выделенные из семядолей проростков люпина узколистного (*Lupinus angus-*

*tifolius* L., сорт “Дикаф”). Проростки люпина выращивали в течение 5 дней на воде в термостате при 24°C в темноте.

**Выделение митохондрий** осуществляли согласно методике дифференциального центрифугирования, описанной ранее [18], с модификациями. Семядоли люпина промывали дистиллированной водой, высушивали, охлаждали и измельчали в ступке со средой гомогенизации (в соотношении 1 : 4), содержащей 0.5 М сахарозу, 50 мМ MOPS-буфер (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотрейтол и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Гомогенат отфильтровывали через 4 слоя мираклоса и центрифугировали при 4000 g в течение 5 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин, осадок митохондрий ресуспендировали в среде отмывания, содержащей 0.4 М сахарозу, 50 мМ MOPS-буфер (pH 7.2), 5 мМ ЭДТА, 0.1% БСА свободный от ЖК и центрифугировали при 4000 g в течение 5 мин. Для осаждения митохондрий супернатант центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин. Выделенные митохондрии ресуспендировали в малом объеме среды, содержащей 0.3 М сахарозу, 20 мМ Непес-Трис-буфер (pH 7.2) и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Суспензию митохондрий хранили на льду. Все операции проводили в холодной комнате при 2–4°C.

**Поглощение кислорода** митохондриями измеряли на полярографическом приборе Oxytherm Electrode Control Unit (“Hansatech Instruments”, Англия). Инкубационная среда (1 мл) при 25°C содержала 0.3 М сахарозу, 20 мМ Непес-Трис-буфер (pH 7.2), 5 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.2), 0.1% БСА, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ сукцинат, 5 мМ глутамат (необходимый для удаления оксалоацетата) и 0.5 – 0.6 мг белка митохондрий. Остальные добавки и условия экспериментов приведены в подписях к таблицам и рисункам. Скорость поглощения кислорода митохондриями в состоянии 3 и 4, величину коэффициента дыхательного контроля (ДК) рассчитывали по методу [19]. Количество митохондриального белка определяли по методу Lowry с соавт. [20], используя БСА в качестве стандарта.

**Образование перекиси водорода в митохондриях** тестировали с использованием 2,7-дихлороди-гидрофлуоресцеин диацетата (DCFDA) по методу Degli-Esposti [21] в модификации Belt et al. [17]. Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировали в среде (1 мл), содержащей 0.3 М сахарозу, 20 мМ Непес-Трис-буфер (pH 7.2), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1% БСА, 5 мМ сукцинат, 5 мМ глутамат, 1 мкМ DCFDA, 1 Е/мл НР. Флуоресценцию дихлородифлуоресцеина (DCF) регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi-850 (“Hitachi”, Япония), длина волны возбуждения – 480 нм, регистрации – 520 нм и рассчитывали скорость образования перекиси в относительных единицах. Для выявления неспе-

**Таблица 1.** Влияние мелатонина на скорость окисления сукцината в разных метаболических состояниях и величину дыхательного контроля (ДК) в митохондриях семян люпина

Вариант	Состояние 3 ( $V_3$ )	Состояние 4 ( $V_4$ )	ДК ( $V_3/V_4$ )
Контроль	226 ± 17	69 ± 5	3.3 ± 0.05
10 мкМ мелатонин	231 ± 15	68 ± 4	3.4 ± 0.1
100 мкМ мелатонин	211 ± 13	67 ± 6	3.2 ± 0.06
500 мкМ мелатонин	234 ± 16	71 ± 8	3.3 ± 0.09

Примечание: состав среды инкубации приведен в разделе Материалы и методы. Дополнительные добавки: 10, 100 или 500 мкМ мелатонина, 100 мкМ АДФ, суспензия митохондрий (0.6–0.7 мг белка/мл).  $V_3$  – скорость окисления субстрата в присутствии АДФ (состояние 3),  $V_4$  – скорость окисления субстрата после исчерпания АДФ (состояние 4). Скорости окисления сукцината выражены в нг-атом  $O_2$ /(мин мг белка).

цифического действия СК на флуоресценцию DCF в контрольных опытах измерения проводили в отсутствие субстрата дыхания. При этом скорость образования перекиси водорода митохондриями определяли разностью опытных и контрольных значений флуоресценции индикатора [17].

В работе использованы соли ( $MgCl_2$ ,  $KH_2PO_4$  и другие) отечественного производства (о. с. ч. или х. ч.), а также дыхательные субстраты, нуклеотиды, ингибиторы, БСА, MOPS, DCFDA, СК, мелатонин и другие реактивы производства фирмы “Sigma” (США).

Все опыты и серии опытов были выполнены минимум в трех биологических и трех аналитических повторностях. На рисунках представлены данные характерных опытов, в таблицах и графиках представлены средние значения и их стандартные отклонения. В некоторых случаях средние значения сравнивали по *t*-критерию Стьюдента ( $P < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

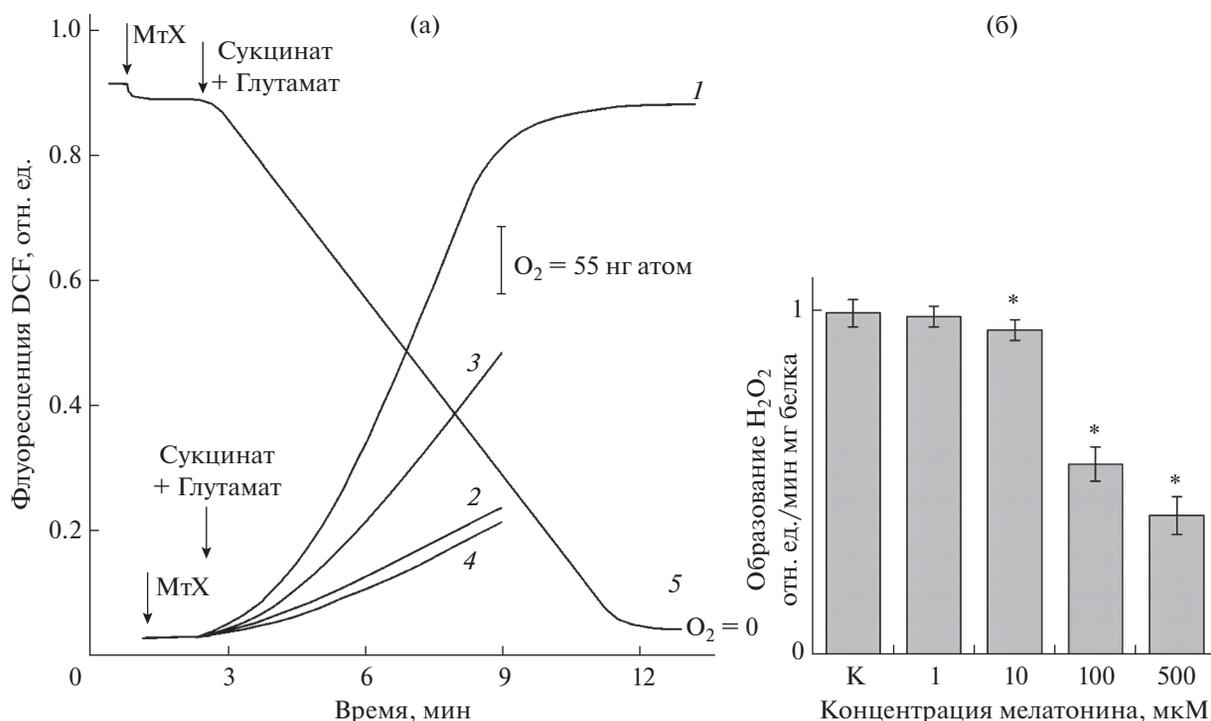
### *Влияние мелатонина на дыхание и генерацию перекиси водорода митохондриями при окислении сукцината*

Митохондрии, изолированные из семян люпина 5-дневных этиолированных проростков люпина узколистного, при инкубации в стандартной сахарозной реакционной среде характеризовались высокой скоростью окисления дыхательных субстратов, в частности сукцината, которая существенно стимулировалась добавкой АДФ (состояние 3) и тормозилась после его исчерпания в процессе синтеза АТФ (состояние 4) (табл. 1). При этом величина ДК по Чансу (состояние 3/состояние 4) составляла около 3, что свидетельствовало о прочном сопряжении процессов окисления и фосфорилирования и высокой интактности внутренней мембраны органелл. В предварительных опытах нами было показано, что присутствие в среде инкубации 100 мкМ мелатонина не оказывало существенного влияния на скорость окисления сукцината митохондриями растений в раз-

ных метаболических состояниях, а также на величину ДК [22]. В данной работе мы изучили действие мелатонина на дыхание митохондрий семян люпина в широком диапазоне концентраций (10–500 мкМ). Было подтверждено, что в используемых нами условиях мелатонин даже в очень высоких и, очевидно, нефизиологических концентрациях (100–500 мкМ) не вызывал статистически достоверных изменений в скорости окисления сукцината, а также в величине коэффициента ДК (табл. 1). Аналогичные результаты были получены нами при изучении действия мелатонина на окисление митохондриями люпина других дыхательных субстратов ЦТК, в частности малата (данные не приведены). Интересно, что указанные высокие концентрации мелатонина существенно ингибировали окисление малата в состоянии 3 в митохондриях печени мыши, но увеличивали активность отдельных комплексов ЭТЦ (особенно комплексов I и IV) в опытах, проведенных на субмитохондриальных частицах, полученных из этих органелл [23]. Возможно, что подобные различия в действии гормона обусловлены различными условиями проведения экспериментов и/или более низкой проницаемостью внутренней мембраны митохондрий растений для экзогенного мелатонина.

Поскольку митохондрии являются одним из центров образования АФК в клетках растений и одновременно одной из наиболее уязвимых мишеней окислительного стресса, представляет интерес изучение механизмов, регулирующих образование и поддержание баланса АФК в этих органеллах, а также возможное участие в этом процессе фитогормонов.

На рис. 1 показано влияние мелатонина на образование перекиси водорода интактными митохондриями семян люпина при окислении сукцината, которое тестировали, используя индикатор DCFDA. Известно, что DCFDA способен проникать в митохондрии (где происходит его деацетилирование) и реагировать, помимо перекиси, с другими формами АФК и некоторыми активными формами азота [21, 24]. Однако, в ра-

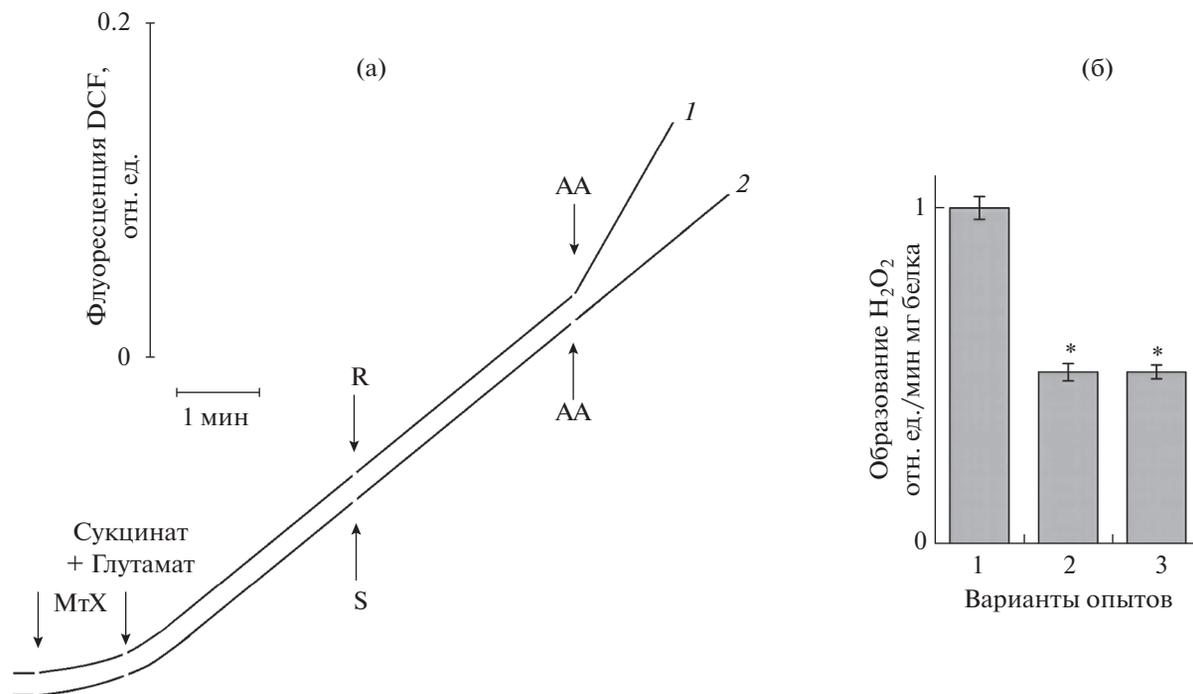


**Рис. 1.** Влияние мелатонина на продукцию перекиси водорода при окислении сукцината митохондриями (МтХ) семян люпина. Состав среды инкубации приведен в разделе Материалы и методы; дополнительно вносили 1–500 мкМ мелатонина. а – динамика образования  $H_2O_2$  митохондриями при окислении сукцината (кривая 1, контроль) и влияние на нее: 5 мМ аскорбиновой кислоты (кривая 2), 100 мкМ мелатонина (кривая 3) и отсутствия в среде инкубации дыхательного субстрата (кривая 4). Поглощение кислорода митохондриями семян люпина при окислении сукцината (кривая 5). б – дозозависимое ингибирование мелатонином образования  $H_2O_2$  митохондриями люпина при окислении сукцината. \* – достоверные различия по сравнению с контролем (уровень значимости  $P < 0.05$ ).

ботах, выполненных с использованием этого индикатора, в том числе на митохондриях растений, часто указывают на определение именно уровня перекиси водорода, поскольку другие виды АФК, в частности супероксидный радикал, являются нестабильными [17, 21]. Следует также отметить, что, хотя этот индикатор удобен в работе и вплоть до настоящего времени широко применяется при определении уровня АФК в митохондриях и тканях растений и животных, его использование имеет ряд ограничений, требует наличия дополнительных контролей, а также осторожности в трактовке полученных результатов [17, 24].

Как показано на рис. 1а, кривая 1, интенсивность образования АФК (перекиси водорода) при окислении сукцината в митохондриях семян люпина, измеренная с помощью DCFDA, носит нелинейный характер. Вначале наблюдалось постепенное увеличение сигнала, что связано, по-видимому, с проникновением индикатора в митохондрии, его деацетилированием и окислением до DCF. Затем в течение нескольких минут генерация АФК митохондриями происходила с примерно одинаковой скоростью, а затем следовало ее резкое ингибирование. Начало торможения образования перекиси водорода митохондриями

по времени коррелировало с существенным (до 30–35% от исходного) падением уровня кислорода в кювете, в процессе окисления сукцината, что проверялось нами в параллельных опытах в аналогичных условиях с помощью кислородного электрода (рис. 1а, кривая 5). Учитывая это, в дальнейшем мы оценивали влияние мелатонина именно на линейную скорость образования перекиси водорода митохондриями при окислении сукцината, когда уровень кислорода в кювете был не ниже 50% от исходного. Как показано на рис. 1а, кривая 3, добавка в среду инкубации 100 мкМ мелатонина заметно ингибировала продукцию  $H_2O_2$  митохондриями семян люпина. Антиоксидантное действие мелатонина подтверждалось аналогичным влиянием на генерацию  $H_2O_2$  аскорбиновой кислоты (рис. 1а, кривая 2). Наличие слабого неспецифического сигнала DCF при отсутствии дыхательного субстрата в среде свидетельствовало о зависимости генерации АФК митохондриями от работы ЭТЦ (рис. 1а, кривая 4). Таким образом, достоверность результатов, полученных нами с использованием DCFDA, подтверждается проведением контрольных экспериментов, показавших строгую зависимость скорости генерации АФК (перекиси водорода)



**Рис. 2.** Действие ингибиторов дыхания на образование  $H_2O_2$  при окислении сукцината митохондриями люпина и на уровень ее торможения мелатонином. Состав среды инкубации приведен в разделе Материалы и методы. а – изменение флуоресценции DCF при окислении сукцината в присутствии ингибиторов ЭТЦ, где указано дополнительно внесли: 20 мкМ ротенон (R), 5 мкМ антимицин А (AA) (кривая 1), а также 7 мкМ стигмателлин (S), 5 мкМ AA (кривая 2). б – влияние стигмателлина (7 мкМ) на уровень ингибирования мелатонином (100 мкМ) образования  $H_2O_2$  при окислении сукцината. Варианты опытов: 1 – митохондрии в присутствии сукцината (контроль), 2 – митохондрии в присутствии сукцината и мелатонина, 3 – митохондрии в присутствии сукцината, мелатонина и стигмателлина \* – достоверные различия по сравнению с контролем (уровень значимости  $P < 0.05$ ).

митохондриями от активности дыхательной цепи, уровня кислорода в среде инкубации и присутствия в ней известных антиоксидантов.

Результаты аналогичных опытов по влиянию различных концентраций мелатонина на образование  $H_2O_2$  митохондриями семядолей люпина при окислении сукцината приведены на рис. 1б. Видно, что присутствие мелатонина в среде инкубации заметно снижало скорость образования перекиси водорода митохондриями (до 45–50% ингибирования в присутствии 100 мкМ мелатонина) и зависело от концентрации гормона, начиная с 10 мкМ. Это подтверждают данные, полученные нами ранее с использованием другого флуоресцентного индикатора (Amplex Red) [22], а также согласуется с результатами аналогичных исследований, проведенных на митохондриях животных [11, 12].

Известно, что окисление субстратов ЦТК в митохондриях животных и растений сопровождается образованием АФК в трех комплексах ЭТЦ (I, II и III) [1, 17]. С использованием известных ингибиторов дыхания, оптимальные концентрации которых были подобраны нами в предварительных опытах, мы попытались определить основной сайт дыхательной цепи, который ответственен за генера-

цию АФК при окислении сукцината с участием СДГ (сукцинатдегидрогеназа) комплекса II в митохондриях семядолей люпина. Это представляло дополнительный интерес, учитывая имеющиеся литературные данные о том, что мелатонин в микромолярных концентрациях, по-видимому, способен проявлять также прооксидантные свойства, стимулируя образование АФК в комплексе III (убихинон-цитохром *c* редуктаза) митохондрий животных (клетки почек), которое было чувствительно к антимицину А [25]. В наших опытах было показано, что, во-первых, образование АФК в митохондриях семядолей люпина при окислении сукцината не тормозилось ротеноном, классическим ингибитором комплекса I (NADH-убихинон оксидоредуктазы), что свидетельствовало об отсутствии его вовлеченности в генерацию АФК посредством обратного транспорта электронов (ОТЭ). Во-вторых, добавка в среду инкубации митохондрий антимицина А, ингибирующего перенос электронов в комплексе III, связываясь с убихиноном в точке  $Q_i$  (ближе к внутренней стороне мембраны) заметно увеличивала скорость образования АФК, что прямо указывало на участие этого комплекса в генерации АФК, по крайней мере, в присутствии ингибитора (рис. 2, кривая 1) [26]. Нако-

**Таблица 2.** Влияние салициловой кислоты на скорость окисления сукцината в разных метаболических состояниях и величину ДК в митохондриях семян люпина

Вариант	Состояние 3 ( $V_3$ )	Состояние 4 ( $V_4$ )	ДК ( $V_3/V_4$ )
Контроль	220 ± 14	68 ± 13	3.2 ± 0.06
100 мкМ СК	216 ± 23	85 ± 18*	2.5 ± 0.03*
500 мкМ СК	179 ± 22	94 ± 16*	1.9 ± 0.05*

Примечание: состав среды инкубации, как для таблицы 1. Дополнительно вносили 100 или 500 мкМ СК. Скорости окисления субстрата выражены в нг-атом  $O_2$ /(мин мг белка). \* – достоверные различия по сравнению с контролем (уровень значимости  $P < 0.05$ ).

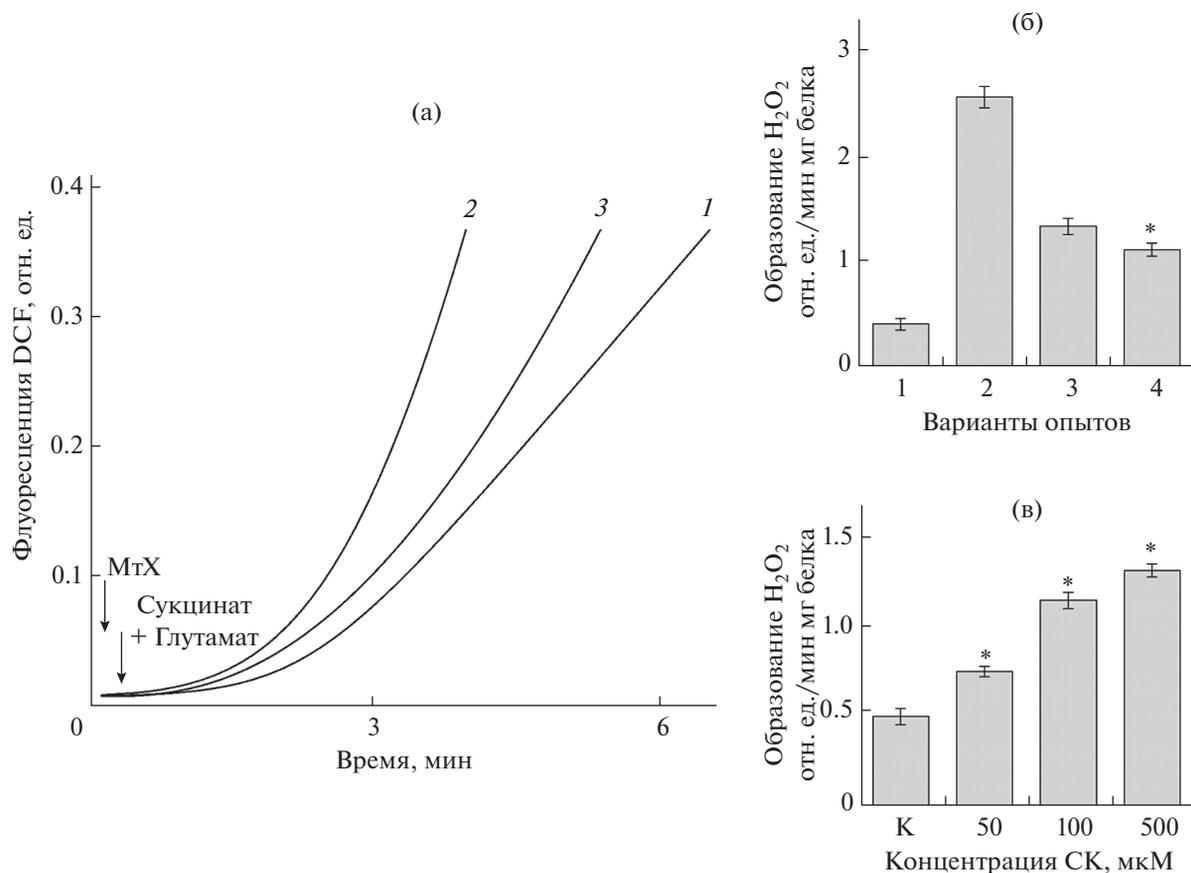
нец, добавка в среду инкубации митохондрий стигмателлина, ингибитора комплекса III в точке  $Q_0$  (ближе к внешней стороне мембраны), не тормозила образование АФК при окислении сукцината и, кроме того, предотвращала ее активацию антимицином А (рис. 2, кривая 2). На основании полученных результатов, а также высокой чувствительности продукции АФК при окислении сукцината к ингибитору СДГ малонату (85–95% подавления), можно заключить, что в митохондриях семян люпина основной вклад в этот процесс вносит комплекс II (сукцинат-убихинон редуктаза). Далее, учитывая результаты предыдущих опытов, мы попытались выяснить, насколько сильное влияние на антиоксидантные свойства мелатонина оказывала возможная активация этим гормоном продукции АФК в комплексе III при окислении сукцината? Судя по данным, представленным на рис. 2б, это влияние было незначительным, поскольку уровень ингибирования мелатонином (100 мкМ) образования АФК при окислении сукцината в митохондриях семян люпина практически не зависел от присутствия в среде инкубации стигмателлина, блокирующего перенос электронов в этом комплексе.

#### Влияние СК на дыхание и генерацию АФК митохондриями семян люпина

Ранее показано, в том числе и в наших исследованиях, что СК способна оказывать прямое действие на процесс окислительного фосфорилирования, разобщая и ингибируя дыхание митохондрий в зависимости от ее концентрации, продолжительности воздействия, а также чувствительности к фитогормону органелл, выделенных из различных растительных объектов [14, 18, 27, 28]. Результаты опытов по изучению влияния различных концентраций СК на окисление сукцината в присутствии глутамата в митохондриях семян люпина *L. angustifolius* приведены в табл. 2. Видно, что в более низкой концентрации СК незначительно разобщала дыхание митохондрий, что проявлялось, в первую очередь, в увеличении скорости окисления субстрата в состоянии 4, в отсутствие АДФ. Однако, это разобщение было неполным, поскольку скорость разобщенного дыхания была существенно ниже скорости погло-

щения кислорода митохондриями в состоянии 3. Разобщающее действие СК сопровождалось также снижением величины ДК, т.е. частичным ослаблением прочности сопряжения процессов окисления и фосфорилирования и снижением эффективности работы дыхательной цепи (табл. 2). Следует также отметить, что при увеличении концентрации СК (500 мкМ) наблюдалось уже заметное ингибирование окисления сукцината в состоянии 3 и резкое снижение ДК (табл. 2).

С использованием трансгенных растений арабидопсиса было обнаружено, что митохондрии, будучи одной из мишеней регуляторного действия СК, играют важную роль в процессе формирования стресс-устойчивости растений [14, 16, 17]. При этом были получены доказательства участия СК в митохондриальном сигналинге, основанном на существенной активации под влиянием гормона образования перекиси водорода органеллами при окислении сукцината, катализируемого комплексом II ЭТЦ (СДГ) [17]. С использованием аналогичного методического подхода мы исследовали влияние СК на образование перекиси водорода при окислении сукцината митохондриями семян люпина. Было показано, что присутствие в среде инкубации митохондрий 100 мкМ СК, действительно, вызывало очень значительное увеличение сигнала DCF (рис. 3а, кривая 2) по сравнению с контролем (рис. 3а, кривая 1), что свидетельствовало о гормональной стимуляции скорости образования перекиси водорода митохондриями *L. angustifolius* при окислении сукцината. Аналогичные результаты были получены китайскими учеными на митохондриях листьев *A. thaliana* [16]. Однако оказалось, что добавка СК в среду инкубации митохондрий в отсутствие сукцината также заметно увеличивала флуоресценцию индикатора (рис. 3а, кривая 3). Этот негативный контроль показывает существенное увеличение базового сигнала DCF в присутствии СК, очевидно, не связанного с генерацией АФК в дыхательной цепи митохондрий. Полученные нами результаты согласуются с данными австралийских исследователей, которые на митохондриях *A. thaliana* показали, что только разница между интенсивностью сигнала DCF в отсутствие и в присутствии дыхательного субстрата выявляет реальную активацию скорости образова-



**Рис. 3.** Влияние СК на генерацию  $H_2O_2$  митохондриями семян люпина при окислении сукцината. Состав среды инкубации как для рисунка 1, дополнительно вносили 50–500 мкМ СК. а – изменение флуоресценции DCF в присутствии: сукцината (кривая 1, контроль), сукцината и 100 мМ СК (кривая 2), 100 мкМ СК, но в отсутствие субстрата (кривая 3); б – определение влияния СК на образование перекиси водорода с учетом неспецифического действия гормона. Варианты опытов: 1 – митохондрии в присутствии сукцината (контроль), 2 – митохондрии в присутствии сукцината и СК, 3 – митохондрии в отсутствие субстрата, но в присутствии СК, 4 – выявление реальной стимуляции СК образования АФК митохондриями люпина, как разницы между флуоресценцией DCF в вариантах 2 и 3; в – влияние различных концентраций СК на образование  $H_2O_2$  в митохондриях семян люпина при окислении сукцината. \* – достоверные различия по сравнению с контролем (уровень значимости  $P < 0.05$ ).

ния  $H_2O_2$  дыхательной цепью под влиянием СК [17]. Но даже с учетом этого, СК существенно, примерно в 2.0–2.5 раза, усиливала образование  $H_2O_2$  митохондриями семян люпина при окислении сукцината (рис. 3б). При этом увеличение концентрации СК (500 мкМ) в инкубационной среде выявило дополнительную (на 15–20%) активацию образования АФК митохондриями семян люпина (рис. 3в).

Таким образом, нами впервые было проведено сравнительное исследование влияния СК и мелатонина на дыхание и генерацию АФК митохондриями растений. Полученные результаты показали, что фитогормоны способны оказывать противоположно-направленное и дозо-зависимое действие на интенсивность процесса образования АФК митохондриями семян люпина в широком диапазоне, от его кратной активации до значительного ингибирования. При этом, регуляторное действие двух гормонов на генерацию АФК митохондриями может осу-

ществляться различными путями. Так, мелатонин, не оказывая в используемых нами условиях существенного влияния на скорость окисления сукцината в различных метаболических состояниях (табл. 1), проявляет антиоксидантную функцию, по всей вероятности, путем гашения (инактивации) различных АФК, генерируемых дыхательной цепью. В этой связи следует отметить, что, судя по литературным данным, протекторное действие мелатонина и его производных на митохондрии оказалось сопоставимо или даже превосходило защитную АФК-гасящую активность других природных и синтетических антиоксидантов [11–13]. Кроме того, имеются сведения о влиянии мелатонина на активность ряда ключевых антиоксидантных ферментов митохондрий животных, включая СОД и глутатионпероксидазу [11]. Показано также, что мелатонин может увеличивать активность и экспрессию генов некоторых разобщающих белков митохондрий, которые явля-

ются важным механизмом, снижающим уровень АФК в этих органеллах [12].

Механизмы регуляторного влияния СК на скорость образования АФК митохондриями растений, по-видимому, не менее разнообразны. В этом процессе могут быть задействованы: АФК-генерирующие переносчики дыхательной цепи (комплексы II и III) [16, 17], гексокиназа, локализованная на внешней мембране органелл [27], и, по-видимому, некоторые антиоксидантные ферменты митохондрий [14], на активность которых СК оказывает прямое действие. Например, было показано, что СК в низких физиологических концентрациях (10–50 мкМ) активировала перенос электронов в комплексе II, на уровне сукцинат-убихинон редуктазы. При этом существенно возрастала скорость образования супероксида при окислении сукцината, который в дальнейшем трансформировался в  $H_2O_2$  с участием СОД в матриксе митохондрий [17]. Кроме того, регуляция активности альтернативной оксидазы митохондрий растений, препятствующей избыточному образованию АФК в дыхательной цепи, особенно в неблагоприятных условиях внешней среды, также осуществляется с участием СК посредством ее влияния на экспрессию генов, кодирующих этот фермент [1, 4–6]. Очевидно, что наличие такого уникального для растений механизма гормональной регуляции уровня АФК и редокс-гомеостаза митохондрий должно иметь важное значение для функционирования как самих органелл, так и клетки в целом. Конечно, это не отрицает важности других известных путей регуляторного воздействия СК и мелатонина на активность немитохондриальных АФК-генерирующих систем и антиоксидантных ферментов в ходе ответной реакции растений на неблагоприятные условия среды [10, 14].

Следует также отметить, что полученные в данной работе результаты подтверждают высказанное нами ранее предположение о том, что причиной (или одной из причин) повышения протонной проницаемости внутренней мембраны митохондрий семейства люпина и диссипации мембранного потенциала под влиянием экзогенной СК является окислительный стресс, индуцирующий открытие АФК-зависимой поры (РТР) [29]. Способность СК индуцировать пермеабиллизацию внутренней мембраны вследствие открытия РТР в условиях окислительного стресса была показана на митохондриях печени крысы [30]. Кроме того, на митохондриях животных была неоднократно продемонстрирована протекторная роль антиоксидантов, в том числе мелатонина, препятствующая индукции РТР [11, 12]. Проведение аналогичных опытов на митохондриях растений представляет интерес, и полученные при проведении этих исследований результаты, несомненно, помогут выявить множественность механизмов регуляторного воздействия стрессовых фитогормонов на метаболическую активность митохондрий, что будет способствовать лучшему

пониманию роли этих органелл в процессах формирования устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гребельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л., Побежимова Т.П., Катышев А.И., Павловская Н.С., Королева Н.А., Любушкина И.В., Башмаков В.Ю., Попов В.Н., Боровский Г.Б., Войников В.К.* Митохондриальные энерго-рассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и “внешняя” NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // *Биохимия*. 2014. Т. 79. С. 645.
2. *Logan D.C.* The mitochondrial compartment // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 1225. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri151>
3. *Jacoby R.P., Li L., Huang S.B., Lee C., Millar A.H., Taylor N.L.* Mitochondrial composition, function and stress response in plants // *J. Integr. Plant Biol.* 2012. V. 54. P. 887. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01177.x>
4. *Atkin O.K., Macherel D.* The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 581. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn094>
5. *Liberatore K.L., Dukowic-Schulze S., Miller M.E., Chen C., Kianian S.F.* The role of mitochondria in plant development and stress tolerance // *Free Radical Biology and Medicine*. 2016. V. 100. P. 238. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.033>
6. *van Aken O., Giraud E., Clifton R., Whelan J.* Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 354. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01240.x>
7. *Apel K., Hirt H.* Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. V. 55. P. 373. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
8. *Hardeland R.* Melatonin in plants – diversity of levels and multiplicity of functions // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Article 198. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00198>
9. *Debnath B., Islam W., Li M., Sun Y., Lu X., Mitra S., Hussain M., Liu S., Qiu D.* Melatonin mediates enhancement of stress tolerance in plants // *Int. J. Plant Sci.* 2019. V. 20 P. 1040. <https://doi.org/10.3390/ijms20051040>
10. *Wang L., Feng C., Zheng X., Guo T., Zhou F., Shan D., Liu X., Kong J.* Plant mitochondria synthesize melatonin and enhance the tolerance of plants to drought stress // *J. Pineal. Res.* 2017. V. 63. e12429. <https://doi.org/10.1111/jpi.12429>
11. *Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S., Galano A., Zhou X.J., Xu B.* Mitochondria: central organelles for melatonin’s antioxidant and anti-aging actions // *Mol-*

- ecules. 2018. V. 23. E509.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23020509>
12. *Tan D.-X., Reiter R.J.* Mitochondria: The birth place, battle ground and the site of melatonin metabolism in cells // *Melatonin Res.* 2019. V. 2. P. 44.  
<https://doi.org/10.32794/mr11250011>
  13. *Fan J., Xie Y., Zhang Z., Chen L.* Melatonin: A multifunctional factor in plants. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 1528.  
<https://doi.org/10.3390/ijms1905128>
  14. *Poore P.* Effect of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants // *Bio-molecules.* 2020. V. 10. P. 341.  
<https://doi.org/10.3390/biom10020341>
  15. *Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F.* // Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease // *Annu. Rev. Phytopatol.* 2009. V. 47. P. 177.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
  16. *Nie S., Yue H., Zhou J., Xing D.* Mitochondria-derived reactive oxygen species play a vital role in the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS One.* 2015. 10: e0119853.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119853>
  17. *Belt K., Huang S., Thatcher L.F., Casarotto H., Singh K.B., Van Aken O., Millar A.H.* Salicylic acid-dependent plant stress signaling via mitochondrial succinate dehydrogenase. // *Plant Physiol.* 2017. V. 173. P. 2029.  
<https://doi.org/10.1104/pp.1600060>
  18. *Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Андреев И.М., Шугаева Н.А.* Влияние салициловой кислоты на метаболическую активность митохондрий растений // *Физиология растений.* 2014. Т. 61. С. 555.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330314040186>
  19. *Chance B., Williams G.R.* The respiratory chain and oxidative phosphorylation // *Adv. Enzymol.* 1956. V. 17. P. 65.
  20. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265.
  21. *Degli-Esposti M.* Measuring mitochondrial reactive oxygen species. // *Methods.* 2002. V. 26. P. 335.
  22. *Буцанец П.А., Баук А.С., Шугаев А.Г., Кузнецов Вл.В.* Мелатонин ингибирует продукцию перекиси водорода митохондриями растений // *Доклады Академии наук.* 2019. Т. 489. С. 205.  
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524892205-208>
  23. *Lopez A., Garcia J.A., Escames G., Venegas C., Ortiz F., Lopez L.C., Acuna-Castroviejo D.* Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production // *J. Pineal. Res.* 2009. V. 46. P. 188.  
<https://doi.org/j.1600-079X.2008.000647.x>
  24. *Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J.A., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M., Mann G.E., Moore K., Roberts L.J., Ischiropoulos H.* Measurements reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations // *Free Rad. Biol. Med.* 2012. V. 52. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
  25. *Zhang H.-M., Zhang Y., Zang B.-X.* The role of mitochondrial complex III in melatonin-induced ROS production in cultured mesangial cell // *J. Pineal Res.* 2011. V. 50. P. 78.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00815.x>
  26. *Drose S., Bleier L., Brandt U.* A common mechanism links differently acting complex II inhibitors to cardioprotection. Modulation of mitochondrial reactive oxygen species production // *Mol. Pharmacol.* 2011. V. 79. P. 814.
  27. *Poore P., Patyi G., Szekeres A., Bodi N., Bagyanszki M., Tari I.* Salicylic acid-induced ROS production by mitochondrial electron transport chain depends on the activity of mitochondrial hexokinases in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // *J. Plant Res.* 2019. V. 132. P. 273.  
<https://doi.org/10.1007/S10265-019-01085-y>
  28. *Norman C., Howell K.A., Millar A.H., Whelan J.M., Day D.A.* Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 492.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.031039>
  29. *Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Шугаева Н.А.* Салициловая кислота индуцирует протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий семян долей люпина // *Физиология растений.* 2016. Т. 63. С. 765.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330316060099>
  30. *Battaglia V., Salvi M., Toninello A.* Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability induction by salicylate in liver mitochondria // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 33864.  
<https://doi.org/10.1074/jbcM502391200>

**УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ,  
СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И АКТИВНОСТЬ  
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ФАКУЛЬТАТИВНОГО  
САМ-РАСТЕНИЯ *Hylotelephium triphyllum* (Naw.) Holub И C<sub>3</sub>-РАСТЕНИЯ  
*Plantago media* L. В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ**

© 2021 г. Е. В. Силина<sup>а</sup>, \*, Г. Н. Табаленкова<sup>а</sup>, Т. К. Головко<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения  
Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

\*e-mail: silina@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 18.09.2020 г.

После доработки 02.11.2020 г.

Принята к публикации 03.11.2020 г.

Исследовали ключевые показатели про-/антиоксидантного состояния листьев подорожника среднего *Plantago media* L. (C<sub>3</sub>-вид) и очитника трехлистного *Hylotelephium triphyllum* (Naw.) Holub (факультативный САМ-вид), произрастающих в несомкнутом ценозе пойменного луга в подзоне средней тайги Республики Коми (европейский Северо-Восток России). В период генеративного развития содержание продуктов перекисного окисления липидов в листьях *H. triphyllum* составляло в среднем 400 нМ/г сухой массы, что в 1.2 раза больше, чем в листьях *P. media*. Содержание пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в листьях *H. triphyllum* достигало 90 мкМ/г сухой массы, тогда как у *P. media* не превышало 25 мкМ/г сухой массы. Уровень активности супероксиддисмутазы (SOD) в листьях *H. triphyllum* варьировал в пределах 50–80 ед/мг белка и был в 2–3 раза выше, чем в листьях *P. media*. Обработка листьев *H. triphyllum* индуктором окислительного стресса – метилвиологеном (10 мкМ) – повышала уровень активности SOD в 1.6 раз, но не повлияла существенно на содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и накопление продуктов липопероксидации. Таким образом, листья *H. triphyllum* характеризовались более высоким про-/антиоксидантным статусом, чем листья обитающего в тех же условиях C<sub>3</sub>-растения *P. media*, что связано с функционированием САМ-фотосинтеза. О переходе *H. triphyllum* на САМ в период генеративного развития указывают выявленные нами ранее закономерные суточные изменения кислотности клеточного сока, содержания малата и активности ФЕП-карбоксилазы. Полученные данные согласуются с представлениями о том, что повышенный про-/антиоксидантный статус является общей характеристикой метаболизма САМ-растений, а стабильно высокое содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может свидетельствовать об участии в регуляции САМ.

**Ключевые слова:** *Plantago media*, *Hylotelephium triphyllum*, C<sub>3</sub>- и САМ-виды, про-/антиоксидантный метаболизм, перекисное окисление липидов, пероксид водорода, супероксиддисмутаза, окислительный стресс

**DOI:** 10.31857/S0015330321040187

**ВВЕДЕНИЕ**

Активные формы кислорода (АФК) образуются в процессе метаболизма растений и выполняют важные функции, участвуют в сигналинге, модулируют процессы жизнедеятельности, являются компонентами адаптивных реакций [1, 2]. Неблагоприятное воздействие факторов окружающей среды является основной причиной избыточного образования АФК, что может привести к окислительному повреждению важнейших биомолекул –

белков, ДНК, липидов, торможению ростовых процессов и снижению продуктивности растений [2]. Поэтому поддержание окислительно-восстановительного баланса является важным условием сохранения структурно-функциональной целостности растительных клеток и тканей. Устойчивость растительных организмов к окислительному стрессу во многом зависит от состояния системы детоксикации АФК, включающей антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты. Однако функция антиоксидантной системы растений состоит не в полном устранении АФК, а в достижении надлежащего баланса между их про-

**Сокращения:** ТБК-РП – продукты липопероксидации, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – пероксид водорода, SOD – супероксиддисмутаза.

изводством и удалением, совместимого с процессами фотосинтеза и в то же время позволяющего эффективно передавать окислительно-восстановительные сигналы в ядро [3].

Эффективность и направленность работы антиоксидантной системы растений зависит от таксономического положения и фазы развития, а также типа, силы и продолжительности воздействия стресс-фактора [4–6]. Несмотря на множество исследований, функционирование про-/антиоксидантного метаболизма растений в природных условиях изучено слабо, а количество модельных видов весьма ограничено. Большой интерес в этом отношении представляют растения, отличающиеся по типу фотосинтетического метаболизма углерода и особенно растения, способные индуцировать переход с  $C_3$  на САМ при стрессовых воздействиях [7]. Следует отметить, что САМ (Crassulaceae Acid Metabolism) осуществляют преимущественно виды растений, обитающие в условиях, где экологические факторы (дефицит влаги, засоление, избыточная инсоляция, высокие температуры и др.) способствуют повышению генерации АФК.

Изучение видов с разным типом фотосинтетического метаболизма углерода показало, что листья САМ-растений накапливали в 2 раза больше  $H_2O_2$ , чем листья  $C_3$ - и  $C_4$ -растений, которые не отличались существенно по этому показателю [4]. Некоторые авторы считают пероксид водорода ключевым метаболитом, участвующим в регуляции перехода с  $C_3$  на САМ тип фотосинтеза [8, 9].

Очитник трехлистный (*Hylotelephium triphyllum* (Naw.) Holub) является одним из немногочисленных видов природной флоры таежной зоны, способных к индукции САМ-фотосинтеза. О переходе с  $C_3$  на САМ свидетельствуют закономерные изменения кислотности клеточного сока, содержания малата и активности ФЕП-карбоксилазы. Нами установлено, что с началом генеративного развития в листьях *H. triphyllum* существенно повышалась кислотность клеточного сока, увеличивалось содержание малата, возрастал уровень активности ФЕП-карбоксилазы [10]. Наиболее выраженные суточные флуктуации этих показателей отмечали в фазу цветения, которая приходится на наиболее теплый период вегетации (июль). В этот период титруемая кислотность клеточного сока листьев очитника в утренние часы достигала 100 нмоль  $[H^+]/г$  сырой массы и снижалась к полудню в 4–5 раз, тогда как в фазу вегетативного роста (май) величина данного показателя варьировала в течение суток в пределах 10–12 нмоль  $[H^+]/г$  сырой массы. Суточные изменения кислотности коррелировали с содержанием малата. Уровень активности ФЕП-карбоксилазы повышался в 1.5 раза на фоне снижения пула органических кислот. Переход *H. triphyllum* на САМ в период генеративного развития способствует

сохранению фотосинтетического аппарата и реализации репродуктивного потенциала растений, обитающих на легко теряющих влагу песчано-супесчаных почвах в условиях гумидного климата таежной зоны европейского Северо-Востока.

Цель работы – провести сравнительное изучение ключевых показателей про-/антиоксидантного статуса листьев *Hylotelephium triphyllum* и *Plantago media* и выявить особенности окислительного метаболизма  $C_3$ - и САМ-растений, обитающих в сходных природных условиях подзоны средней тайги европейского Северо-Востока России.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Очитник трехлистный (*Hylotelephium triphyllum* (Naw.) Holub) – многолетнее травянистое растение сем. Crassulaceae. Побеги монокарпические, плотно облиственные, неразветвленные; листья уплощенные, продолговато-яйцевидной формы с толстой кутикулой. Размножается семенами, частями стеблей и корневища. Вид обычен в лесной зоне. На территории Республики Коми встречается в пойме, на склонах, вырубках, бечевниках. Произрастает на глинистой, песчаной и супесчаной почве, известняках, сланцевых обнажениях и скалах. Суккулентные черты и способность осуществлять  $C_3$ -САМ переход отражают адаптацию этих растений к недостатку влаги [11].

Подорожник средний (*Plantago media* L.) – многолетнее травянистое растение сем. Plantaginaceae. Стебель прямостоячий, чаще восходящий. Листья широколанцетные или эллиптические, плоские, с 7 – 9 жилками, острые, опушенные. Размножается семенами и вегетативным путем. Бореальный евроазиатский вид. На территории Республики Коми встречается на пойменных лугах, по обочинам дорог, в разреженных лесах, бывает пионером на отменях и обнажениях известняка. Типичный  $C_3$ -вид. Как и все виды рода, *P. media* проявляет высокую морфофизиологическую пластичность, способность формировать фенотипы, адаптированные к обитанию в разных экотопах [12].

Полевые исследования проведены в июне–августе 2017 и 2018 гг. в подзоне средней тайги Республики Коми (европейский Северо-Восток России). В работе использовали растения, произрастающие на слабо покрытом растительностью участке с дерново-слоистой песчано-супесчаной, хорошо дренируемой почвой в прирусловой части поймы левого берега р. Вымь (62°16'19.4" N 50°39'29.1" E). Участок расположен вблизи Лесоэкологического стационара Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

Климат района умеренно континентальный. Средняя температура самого теплого месяца июля около +16°C, самого холодного месяца января –16°C. Средняя суточная температура возду-

**Таблица 1.** Погодные условия в районе проведения исследований

Показатель	2017						2018									
	июнь			июль			август		июнь			июль			август	
Средняя за декаду температура воздуха, °С	I	II	III	I	II	III	I	II	I	II	III	I	II	III	I	II
Средняя за декаду температура воздуха, °С	10.1	13.8	12.1	16.1	20.4	18.1	14.6	16.6	6.6	12.9	20.2	17.9	20	19.2	15.2	14.5
Отклонение от нормы, °С	-2	0	-3	0	4	2	0	3	-5	-1	5	2	4	3	0	2
Максимальная температура за декаду, °С	20	27	21	25	30	27	24	24	14	26	32	27	27	30	27	25
Сумма осадков за декаду, мм	25	43	41	2	25	10	49	31	30	19	16	50	35	13	21	8
В процентах к норме, %	115	195	177	10	107	40	211	130	10	86	70	217	150	54	91	37

Примечание: в таблице представлены данные с сайта [www.gp5.ru](http://www.gp5.ru). I, II, III – декады, синоптический индекс метеостанции 237707.

ха выше 10°C наблюдается 90 дней в году. Среднегодовое количество осадков составляет 700 мм, половина приходится на вегетационный период (май–август) [13]. В целом, погодные условия в годы проведения исследований соответствовали среднесезонным значениям регионального климата, но в отдельные периоды вегетации наблюдались отклонения в ту или иную сторону (табл. 1).

*Микроклиматические условия* (освещенность, температура и влажность воздуха) в местах обитания растений регистрировали во время отбора образцов с помощью портативной метеостанции LI-1400 (“LI-COR”, США) с набором датчиков. Определения показали, что в ясный солнечный день освещенность на уровне растений достигала 1400–1600 мкмоль квантов/м<sup>2</sup> с, а интенсивность УФ (А + В)-радиации – 15 Вт/м<sup>2</sup>. Относительная влажность воздуха варьировала в пределах от 30 до 80%. Температура поверхности листьев в полуденные часы превышала температуру воздуха в среднем на 2–3°C.

Для характеристики ключевых показателей состояния про-/антиоксидантной системы исследуемых растений использовали функционально зрелые листья. Образцы (по одному листу с 25–30 растений) отбирали в период генеративного развития растений (июнь–август) ранним утром (6 ч), днем (11–16 ч) и поздним вечером (21–22 ч). Высечки (1–1.5 см) средней части листовой пластинки массой около 500 мг помещали в сосуд с жидким азотом, транспортировали в лабораторию и хранили до проведения анализов при температуре –70°C. Содержание сухого вещества определяли в образцах, высушенных до постоянной массы при 105°C.

*Активность перекисного окисления липидов* оценивали по содержанию в листьях продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [14]. Растительный материал гомогенизировали в 0.1 М Трис-НСl буфере, pH 7.6, содержащем 0.35 М NaCl. В гомогенат добавляли 0.5% ТБК в 20% трихлоруксусной кислоте. Пробы помещали в нагретую до 95–100°C водяную баню на 30 мин. Затем охлаждали и центрифугировали 10 мин при 10000g. Оптическую плотность супернатанта измеряли при длине волны 532 и 600 нм. Здесь и далее использовали двухлучевой спектрофотометр Shimadzu UV-1700 (“Shimadzu”, Япония). Количество ТБК-РП рассчитывали с учетом коэффициента экстинкции ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) после вычитания неспецифического поглощения при 600 нм.

*Содержание пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)* определяли с использованием ксиленолового оранжевого [15]. Образец растирали в жидком азоте, добавляя 4 мл дистиллированной воды. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 12 000 g. Супернатант и реагент смешивали в соотношении 1 : 1. Состав реагента: 0.5 mM Fe(NH<sub>4</sub>)(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (соль Мора), 0.5% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 мкМ ксиленолового оранжевого (“Sigma”) и 200 mM сорбитола. Смесь инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали в течение 5 мин при 10000 g. Оптическую плотность раствора измеряли при 560 нм. Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяли по калибровочным зависимостям. Проверку на специфичность проводили по ингибированию образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при добавлении каталазы (активность 500 ед/мг белка, производитель “Sigma”).

*Активность супероксиддисмутазы (SOD)* определяли по ее способности подавлять фотохимиче-

ское восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) [16]. Реакционную смесь готовили на 0.1 М Na-фосфатном буфере, pH 7.8. В состав реакционной среды входили: L-метионин 39 мкМ, НСТ 0.245 мкМ, Тритон X-100 1% раствор и Na-ЭДТА 0.3 мкМ (все реактивы производства “Sigma”). К пробе добавляли 0.1 мл супернатанта, к контролю вместо супернатанта добавляли 0.1 мл Na-фосфатного буфера. Для запуска ферментативной реакции вносили водный раствор рибофлавина (117 мкМ). После смешивания содержимое проб освещали в течение 10 мин при 40 клк. Пробирка с белком, находившаяся в темноте, служила контрольной пробой. Оптическую плотность измеряли при 560 нм. Активность SOD выражали в ед/мг белка.

Содержание растворимого белка анализировали по методу Bradford [17], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Для индукции окислительного стресса в листьях *H. triphyllum* использовали метилвиологен (паракват). Отделенные листья экспонировали в растворе метилвиологена (10 мкМ) в течение 12 ч в темноте, затем выставляли на 2 ч на умеренный свет (интенсивность ФАР 600 мкмоль квантов/м<sup>2</sup> с). Контрольные листья помещали в воду, остальные манипуляции проводили, как и с опытными листьями. После завершения эксперимента образцы листьев фиксировали в жидком азоте.

Все анализы проводили в 3–5-кратной биологической и 2–3-кратной аналитической повторности. Для сравнения средних величин применяли дисперсионный анализ ANOVA (критерий Дункана). Расчеты осуществляли при заданном уровне значимости  $P \leq 0.05$ . На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Интенсивность перекисного окисления липидов принято рассматривать как один из показателей уровня окислительного стресса. Мы оценивали активность липопероксидации по накоплению в листьях продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

В период генеративного развития содержание ТБК-РП в листьях *H. triphyllum* варьировало в зависимости от времени суток и сроков определения от 300 до 500 нМ/г сухой массы (рис. 1). В полуденное и послеполуденное время количество ТБК-РП в листьях было в среднем на 15–25% больше, чем рано утром или поздно вечером. Суточная динамика изменения содержания ТБК-РП в листьях *P. media* не отличалась существенно от таковой в листьях *H. triphyllum*. Однако уровень накопления продуктов липопероксидации был заметно ниже. Максимальные значения содержания ТБК-РП многим превышали 350 нМ/г сухой массы, а ос-

новная часть данных варьировала в пределах 230–280 нМ/г сухой массы.

Листья *H. triphyllum* характеризовались сравнительно высоким накоплением пероксида водорода. Содержание  $H_2O_2$  в них варьировало в зависимости от времени суток и сроков определения в пределах 70–90 мкМ/г сухой массы (рис. 2). В суточной динамике проявлялась тенденция снижения концентрации  $H_2O_2$  в дневные часы. Содержание  $H_2O_2$  в листьях *P. media* не превышало 25 мкМ/г сухой массы, что в 3–4 раза меньше, чем в листьях *H. triphyllum*. В отличие от *H. triphyllum*, концентрация  $H_2O_2$  в листьях *P. media* повышалась в дневные часы, достигая максимальных значений к полудню, затем снижалась.

Уровень активности супероксиддисмутазы в листьях *P. media* варьировал в зависимости от времени суток и сроков определения в пределах от 18 до 28 ед/мг белка (рис. 3). Активность SOD повышалась днем в среднем на 25% и достигала максимальных значений в полуденные и послеполуденные часы. Следует отметить, что активность SOD в листьях *P. media* в конце июля – начале августа была несколько выше, чем в начале июля.

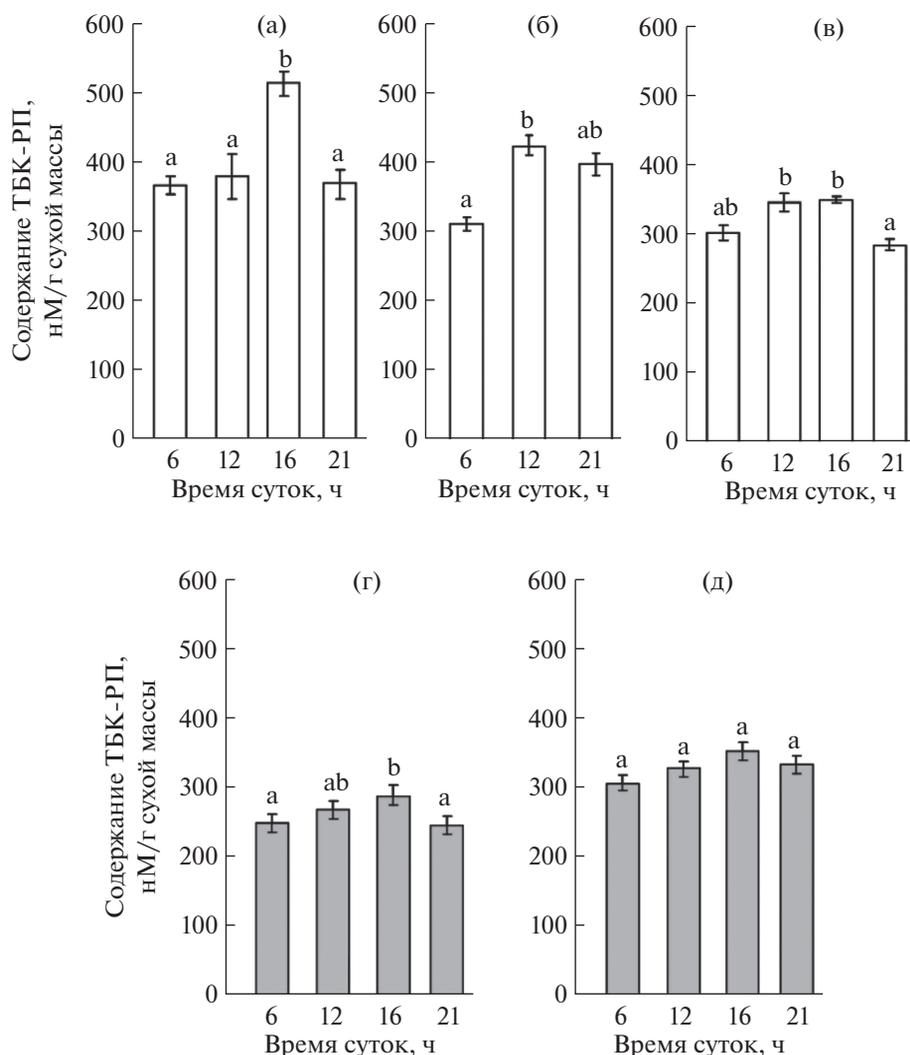
По сравнению с *P. media* уровень активности SOD в листьях *H. triphyllum* был существенно выше, от 40 до 90 ед/мг белка (рис. 3). В начале июля (фаза бутонизации – начало цветения) активность SOD составляла в среднем 50 ед/мг белка, к концу июля – началу августа (фаза массового цветения – начала плодоношения) повышалась в 1.4 – 2.2 раза. Уровень активности SOD в течение суток либо достоверно не изменялся, либо снижался к ночи.

Для тестирования реакции про-/антиоксидантного метаболизма *H. triphyllum* на усиление окислительного стресса свежесобранные листья обрабатывали метилвиологеном. Воздействие метилвиологеном (10 мкМ) в течение 12 ч в темноте с последующей 3 ч экспозицией на свету не оказало влияния на содержание  $H_2O_2$  в листьях (табл. 2). Обработанные листья накапливали меньше (в 1.2 раза) продуктов липопероксидации, чем контрольные. При этом уровень активности SOD в них был в 1.6 раза больше.

Таким образом, нами установлено, что в период генеративного развития растений листья факультативного САМ-вида *H. triphyllum* характеризовались более высоким про-/антиоксидантным статусом, чем листья обитающего в тех же условиях  $C_3$ -вида *P. media*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

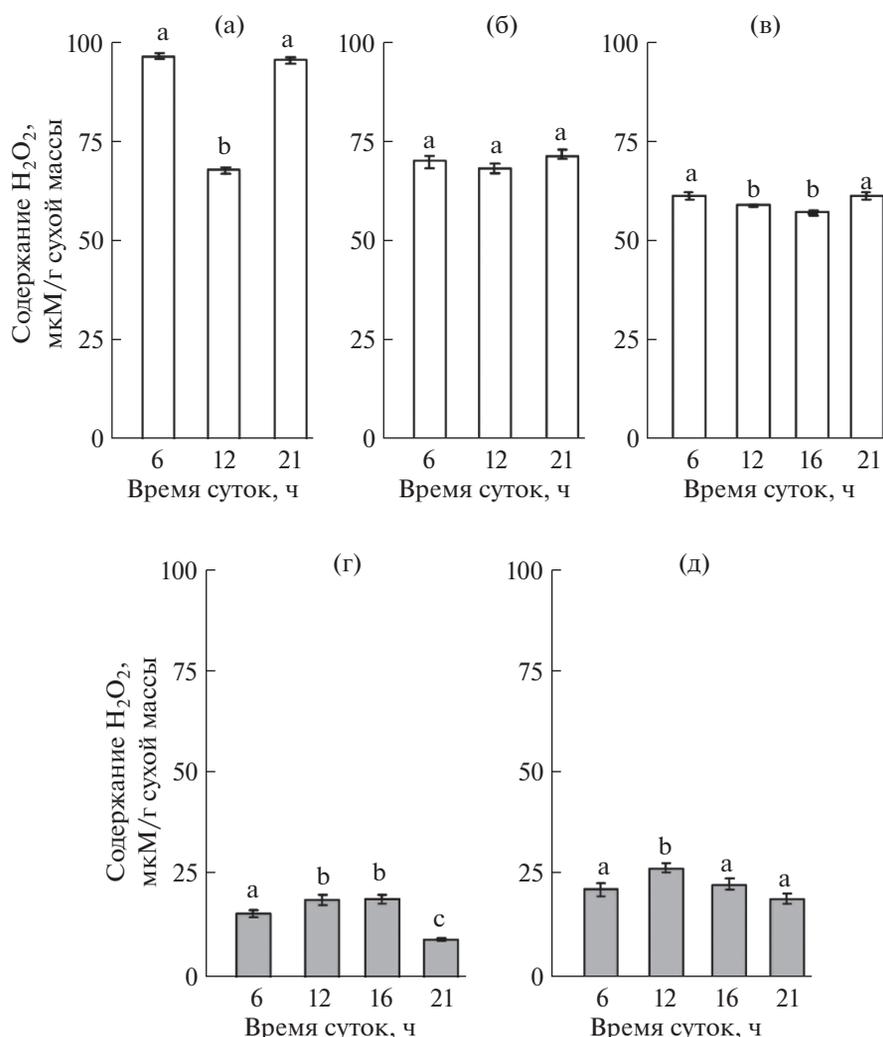
Листья относятся к органам, характеризующимся наиболее высокой активностью энергопластического обмена. В клетках мезофилла функционируют основные источники генерации АФК – хлоропластные и митохондриальные ЭТЦ



**Рис. 1.** Содержание продуктов липопероксидации (ТБК-РП) в листьях *Hylotelephium triphyllum* (а–в) и *Plantago media* (г, д) в период генеративного развития растений: а – начало бутонизации (20–21 июня 2017 г.), б – массовое цветение (19–20 июля 2017 г.), в – массовое цветение/начало плодоношения (30 июля–1 августа 2018 г.), г – бутонизация/начало цветения (2–3 июля 2018 г.), д – массовое цветение/начало плодоношения (1–2 августа 2018 г.). Разные латинские буквы над столбцами обозначают статистически значимые суточные изменения величины исследуемого показателя при  $P \leq 0.05$ .

[1, 2]. Усиление образования АФК в условиях, когда не вся поглощенная энергия может быть использована при фотосинтезе, ведет к нарушению про-/антиоксидантного баланса и интенсификации окислительных процессов в тканях [3]. Хорошими индикаторами про-/антиоксидантного статуса растений, на наш взгляд, могут служить ключевые показатели про-/антиоксидантного метаболизма: накопление продуктов перекисного окисления липидов, содержание  $H_2O_2$  (наиболее стабильная форма АФК) и уровень активности основного фермента антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы. Уникальность SOD состоит в том, что этот фермент контролирует концентрацию  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ .

Нами установлено, что в период генеративного развития листья факультативного САМ-растения *H. triphyllum* характеризовались более высоким про-/антиоксидантным статусом, чем листья обитающего в тех же условиях  $C_3$ -вида *P. media*. В фазу массового цветения, когда признаки САМ у *H. triphyllum* были хорошо выражены [10], его листья накапливали около 400 нМ/г сухой массы продуктов перекисного окисления липидов, что в 1.2 раза больше, чем в листьях *P. media*. Содержание  $H_2O_2$  в листьях *H. triphyllum* достигало 90 мкМ/г сухой массы, тогда как у *P. media* не превышало 25 мкМ/г сухой массы. Уровень активности SOD в листьях *H. triphyllum* в 3 раза выше, чем в листьях *P. media*. Сравнительные данные свидетель-



**Рис. 2.** Содержание пероксида водорода в листьях *Hylotelephium triphyllum* (а–в) и *Plantago media* (г, д) в период генеративного развития растений: а – массовое цветение (19–20 июля 2017 г.), б – начало бутонизации (2–3 июля 2018 г.), в – массовое цветение/начало плодоношения (30 июля–1 августа 2018 г.), г – бутонизация/начало цветения (2–3 июля 2018 г.), д – массовое цветение/начало плодоношения (1–2 августа 2018 г.). Разные латинские буквы над столбцами обозначают статистически значимые суточные изменения величины исследуемого показателя при  $P \leq 0.05$ .

ствуют об интенсивном про-/антиоксидантном метаболизме листьев факультативного САМ-растения *H. triphyllum*, что согласуется с имеющимися в литературе сведениями о содержании АФК в растениях

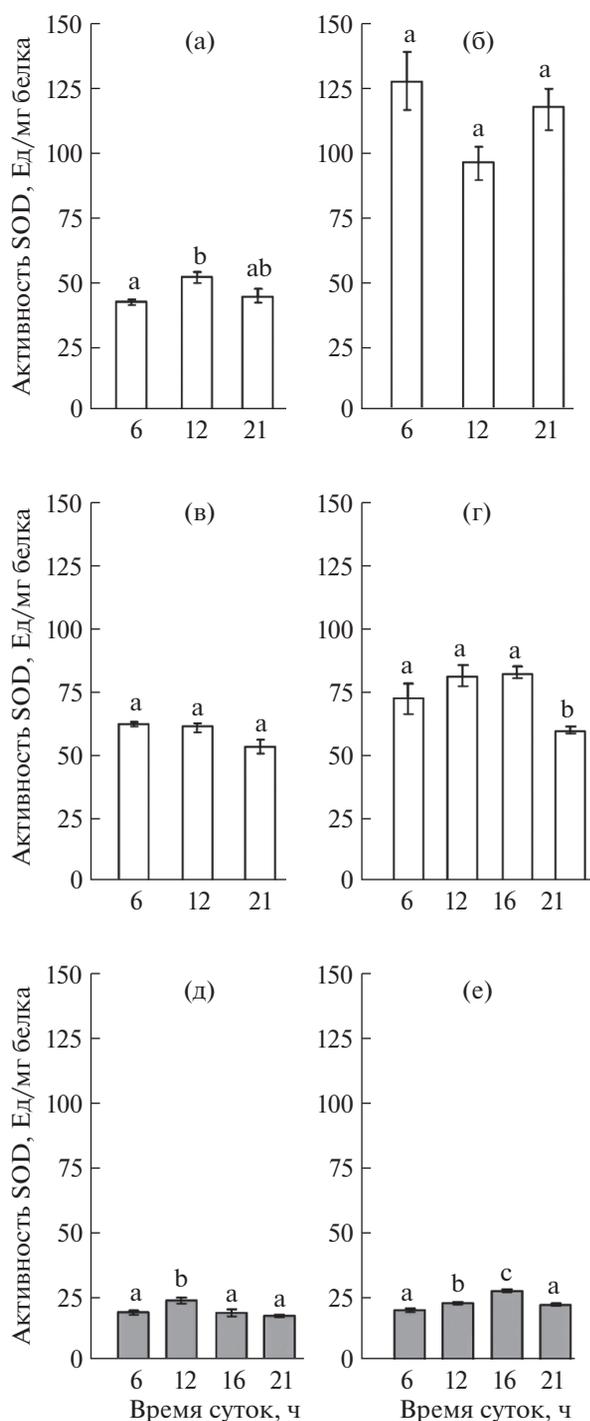
с разным типом фотосинтетического метаболизма углерода [4].

Известно, что в индукции C<sub>3</sub>-САМ перехода важную роль играют факторы внешней среды и, в

**Таблица 2.** Влияние метилвиологена (10 мкМ) на содержание пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), продуктов липопероксидации (ТБК-РП) и активность супероксиддисмутазы (SOD) в листьях *Hylotelephium triphyllum*

Показатель	Вариант	
	Контроль	Опыт
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкМ/ сухой массы	134.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	130.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
ТБК-РП, нМ/г сухой массы	336.0 ± 7.9 <sup>a</sup>	277.2 ± 13.9 <sup>b</sup>
SOD, Ед/мг белка	61.8 ± 12.9 <sup>a</sup>	102.2 ± 8.4 <sup>b</sup>

Примечание: разные латинские буквы обозначают статистически значимые различия величины исследуемых показателей между опытными и контрольными листьями при  $P \leq 0.05$ .



**Рис. 3.** Активность супероксиддисмутазы в листьях *Hylotelephium triphyllum* (а–г) и *Plantago media* (д, е) в период генеративного развития растений: а – начало бутонизации (20–21 июня 2017 г.), б – массовое цветение (19–20 июля 2017 г.), в – начало бутонизации (2–3 июля 2018 г.), г – массовое цветение/начало плодоношения (30 июля–1 августа 2018 г.), д – бутонизация/начало цветения (2–3 июля 2018 г.), е – массовое цветение/начало плодоношения (1–2 августа 2018 г.). Разные латинские буквы над столбцами обозначают статистически значимые суточные изменения величины исследуемого показателя при  $P \leq 0.05$ .

первую очередь, водный дефицит. Считается, что воздействие стресс-факторов приводит к усилению генерации АФК и, как следствие, активации механизмов антиоксидантной защиты в клетках. Однако, вопрос о том, является ли САМ причиной или следствием окислительного стресса окончательно не решен [18]. Так, например, авторы исследования модельного растения *Mesembryanthemum crystallinum* пришли к выводу, что переход на САМ может снижать уровень образования АФК, поскольку способствует поддержанию фотосинтеза при закрытых устьицах [19]. Согласно нашим данным САМ не вносил существенного вклада в рост и накопление биомассы растений *H. triphyllum* [10].

До сих пор дискуссионным остается вопрос, как происходит детекция сигнала и что представляет собой каскад событий, ведущих к индукции САМ. В литературе обсуждается значение  $H_2O_2$  как одного из индукторов  $C_3$ -САМ перехода [8, 9].  $H_2O_2$  является одной из самых распространенных и стабильных форм АФК, способных диффундировать через цитоплазматические и внутриклеточные мембраны по водным каналам – аквапоринам [20].  $H_2O_2$  может влиять на проницаемость плазмодесма, регулируя тем самым транспорт веществ и воды. Показано также, что  $H_2O_2$  участвует в индуцируемом АБК закрывании устьиц [21]. Увеличение содержания  $H_2O_2$  предшествовало переключению на САМ-тип метаболизма растений *M. crystallinum* при добавлении NaCl в корневую среду [22]. Добавление в корневую среду экзогенной  $H_2O_2$  (50, 100 и 200 мМ) приводило к увеличению амплитуды суточных изменений содержания малата [23]. По мнению авторов данной работы, повышение концентрации этого метаболита в ночное время до 400 мМ свидетельствовало об индукции перехода с  $C_3$  на САМ-тип фотосинтетического метаболизма углерода. Интересно отметить, что  $C_3$ -САМ переход сопровождался снижением каталазной активности. Как известно, каталаза играет важную роль в регуляции содержания  $H_2O_2$  в клетках растений. Фермент осуществляет разложение двух молекул  $H_2O_2$  с выделением молекулярного кислорода и воды. Каталаза имеет высокую скорость оборота, но низкое сродство к  $H_2O_2$ , она начинает работать при концентрации  $H_2O_2$  выше  $10^{-6}$  М [24]. Нам не удалось получить достоверные данные о каталазе в листьях *H. triphyllum*, возможно из-за низкого уровня ее активности.

Супероксиддисмутаза является одним из основных ферментов антиоксидантной системы, нейтрализующих супероксид-радикал в реакции дисмутации до молекулярного кислорода и  $H_2O_2$  [25]. Другими словами, образование  $H_2O_2$  зависит от активности SOD. Как уже отмечалось, уровень активности SOD в листьях *H. triphyllum* был в 3 раза

выше, чем у обитающего в тех же условиях типичного  $C_3$ -растения *P. media*. По-видимому, высокое содержание  $H_2O_2$  в листьях *H. triphyllum*, по крайней мере частично, обусловлено повышенной активностью SOD. Это согласуется с имеющимися в литературе данными. Так, например, активность SOD в листьях *Guzmania monostachia* (бромелиевые) увеличивалась при индукции САМ под действием высокой освещенности и водного дефицита [26]. Причем изменения активности SOD в апикальной части листа были выражены в большей степени, чем в базальной. Повышение активности SOD при водном дефиците было обнаружено у различных видов сем. Crassulaceae [27, 28]. Интересно отметить, что у типичного САМ-вида *Sedum album* изменения активности ферментов, контролирующих содержание пероксида водорода — супероксиддисмутазы и каталазы, были выражены сильнее по сравнению с САМ-cycling видом *S. stoloniferum* [28].

Известно, что существует три различных формы SOD, причем Cu/Zn-SOD, в отличие от Fe-SOD и Mn-SOD (соответственно хлоропластная и митохондриальная формы), присутствует в цитозоли, хлоропластах, пероксисомах, межмембранном пространстве митохондрий и апопласте [25]. Так как в данной работе мы не определяли изоформы фермента, то не имеем возможности оценить их вклад в общую активность. Однако тот факт, что уровень активности SOD в листьях *H. triphyllum* был не только существенно выше, но и более стабильным в течение суток позволяет предположить доминирование Cu/Zn-SOD, присутствующей практически во всех клеточных компартаментах.

Поскольку содержание растворимого белка в листьях *P. media* варьировало в пределах 10–15 мг/г сухой массы, а у *H. triphyllum* его концентрация была вдвое меньше, мы пересчитали активность SOD на единицу содержания хлорофилла (данные не приводятся). Выявленные различия в уровне активности SOD в листьях двух исследованных видов сохранялись и не зависели от способа расчета.

Тот факт, что SOD вносит весомый вклад в защиту *H. triphyllum* от окислительного стресса и контролирует накопление пероксида водорода в период функционирования САМ, подтверждается результатами опыта с метилвиологеном. Обработка листьев индуктором окислительного стресса активировала данный фермент. В результате содержание  $H_2O_2$  в листьях оставалось стабильным. Видимо, сохранение стабильно высокого уровня  $H_2O_2$  играет важную роль в регуляции САМ.

Несмотря на многократную разницу в содержании  $H_2O_2$  и активности SOD, исследованные виды сопоставимы по накоплению продуктов перекисного окисления липидов в листьях (разница не превышала 20%). В связи с этим следует отметить, что произрастание *P. media* на открытых участках приводит к формированию светового фенотипа,

характеризующегося меньшим габитусом растений и более высоким уровнем перекисного окисления липидов по сравнению с растениями, обитающими в затененных условиях [29, 30].

Таким образом, нами установлено, что в период генеративного развития листа факультативного САМ растения *H. triphyllum* накапливали в 4–5 раз больше пероксида водорода и отличались высокой активностью SOD по сравнению с листьями обитающего в тех же условиях типичного  $C_3$  растения *P. media*. Обработка листьев *H. triphyllum* индуктором окислительного стресса — метилвиологеном (10 мкМ) — повышала уровень активности SOD, но не повлияла существенно на содержание  $H_2O_2$  и накопление продуктов перекисного окисления липидов. Наши результаты и имеющиеся в литературе сведения указывают на то, что высокий уровень про-/антиоксидантного метаболизма является общей характеристикой САМ-видов и обусловлен ограничением дневной ассимиляции углерода при адаптации к неблагоприятным условиям среды. Учитывая функции пероксида водорода и его стабильно высокое содержание в листьях *H. triphyllum*, логично предположить, что  $H_2O_2$  может участвовать в регуляции САМ. Изучение ключевых показателей, характеризующих про-/антиоксидантный статус растений в природных условиях, позволяет углубить понимание биохимических механизмов и путей их адаптации к условиям среды.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Apel K., Hirt H.* Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction // *Annu. rev. Plant Biol.* 2004. V. 55. P. 373. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
2. *Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // *J. Bot.* 2012. V. 2012. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
3. *Foyer C.H.* Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis // *Environ. Exp. Bot.* 2018. V. 154. P. 134. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
4. *Li J., Zhao X., Matsui S.* Hydrogen peroxide contents and activities of antioxidative enzymes among  $C_3$ ,  $C_4$  and CAM plants // *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 2001. V. 70. P. 747.

5. Lukatkin A.S. Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. The activity of antioxidant enzymes during plant chilling // Russ. J. Plant Physiol. 2002. V. 49. P. 782.
6. Anjum N.A., Umar S., Ahmad A., Iqbal M., Khan N.A. Ontogenic variation in response of *Brassica campestris* L. to cadmium toxicity // J. Plant Interact. 2008. V. 3 (3). P. 189.
7. Winter K., Holtum J.A.M. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: powerful tools for unravelling the functional elements of CAM photosynthesis // J. Exp. Bot. 2014. V. 65 (13). P. 3425. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru063>
8. Slesak I., Karpinska B., Surówka E., Miszalski Z., Karpinski S. Redox changes in the chloroplast and hydrogen peroxide are essential for regulation of C<sub>3</sub>-CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. // Plant Cell Physiol. 2003. V. 44 (6). P. 573. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg073>
9. Slesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S., Miszalski Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses // Acta Biochim. Pol. 2007. V. 54 (1). P. 39. [https://doi.org/10.18388/abp.2007\\_3267](https://doi.org/10.18388/abp.2007_3267)
10. Golovko T.K., Zakhochiy I.G., Tabalenkova G.N. Induction of CAM Photosynthesis in *Hylotelephum triphyllum* (Haw.) Holub (Crassulaceae) under Climatic Condition of the European North-East of Russia // Russ. J. Plant Physiol. 2021. V. 68. P. 179. <https://doi.org/10.1134/S1021443720060047>
11. Головки Т.К., Дальке И.Г., Бачаров Д.С., Бабак Т.В., Захожий И.Г. Толстянковые в холодном климате (биология, экология, физиология). СПб.: Наука, 2007. 205 с.
12. Zakhochiy I.G., Shadrin D.M., Pylina Y.I., Chadin I.F., Golovko T.K. Genetic differentiation of two phenotypes of *Plantago media* L. in South Timan // Ecological Genetics. 2020. V. 18 (2). P. 9. <https://doi.org/10.17816/ecogen15605>
13. Атлас по климату и гидрологии Республики Коми. Москва: Дрофа; ДиК, 1997. 116 с.
14. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125 (1). P. 189.
15. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., Lorenzo G. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. Plant Physiology // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 1379. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
16. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44 (1). P. 276.
17. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.
18. Niewiadomska E., Borland A. M. Crassulacean Acid Metabolism: a Cause or Consequence of Oxidative Stress in Planta? // Progress in Botany 69 / Eds. Lüttge U., Beyschlag W., Murata J., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. P. 247.
19. Sunagawa H., Cushman J., Agarie S. Crassulacean acid metabolism may alleviate production of reactive oxygen species in a facultative CAM plant, the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. // Plant Prod. Sci. 2010. V. 13 (3). P. 256. <https://doi.org/10.1626/ppls.13.256>
20. Borisova (Mubarakshina) M.M., Kozuleva M.A., Rudenko N.N., Naydov I.A., Klenina I.B., Ivanov B.N. Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2012. V. 1817. P. 1314. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.036>
21. Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells // Nature. 2000. V. 406 (6797). P. 731.
22. Slesak I., Libik M., Miszalski Z. The foliar concentration of hydrogen peroxide during salt-induced C<sub>3</sub>-CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum* L. // Plant Science. 2008. V. 174 (2). P. 221. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.007>
23. Surówka E., Dziurka M., Kocurek M., Goraj S., Rapacz M., Miszalski Z. Effects of exogenously applied hydrogen peroxide on antioxidant and osmoprotectant profiles and the C<sub>3</sub>-CAM shift in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. // J. Plant Physiol. 2016. V. 200. P. 102. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.05.021>
24. Mhamdi A., Noctor G., Baker A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians // Arch. Biochem. Biophys. 2012. V. 525. P. 181. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.015>
25. Gill S.S., Anjum N.A., Gill R., Yadav S., Hasanuzzaman M., Fujita M., Mishra P., Sabat S.C., Tuteja N. Superoxide dismutase – mentor of abiotic stress tolerance in crop plants // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22 (14). P. 10375.
26. Abreu M.E., Carvalho V., Mercier H. Antioxidant capacity along the leaf blade of the C<sub>3</sub>-CAM facultative bromeliad *Guzmania monostachia* under water deficit conditions // Funct. Plant Biol. 2018. V. 45 (6). P. 620. <https://doi.org/10.1071/fp17162>
27. Habibi G., Hajiboland R. Comparison of water stress and UV radiation effects on induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae) // Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 2011. V. 53 (2). P. 15. <https://doi.org/10.2478/v10182-011-0020-5>
28. Habibi G., Hajiboland R. Comparison of photosynthesis and antioxidative protection in *Sedum album* and *Sedum stoloniferum* (Crassulaceae) under water stress // Photosynthetica. 2012. V. 50 (4). P. 508.
29. Golovko T.K., Dalke I.V., Zakhochiy I.G., Dymova O.V., Tabalenkova G.N. Functional plasticity of photosynthetic apparatus and its resistance to photoinhibition in *Plantago media* // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. P. 549.
30. Rozentsvet O.A., Golovko T.K., Bogdanova E.S., Tabalenkova G.N., Nesterov V.N., Dymova O.V. Polar lipid pool modification in leaves of hoary plantain (*Plantago media* L.) plants during their light adaptation under natural conditions // Biol. Bull. 2013. V. 40. P. 138. <https://doi.org/10.1134/S1062359013020118>

## ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ O<sub>2</sub>-ЭЛЕКТРОДОВ КЛАРКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

© 2021 г. В. Б. Бородин\*

*Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр  
“Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Россия*

\*e-mail: borodin\_ibbp@mail.ru

Поступила в редакцию 05.05.2020 г.

После доработки 09.07.2020 г.

Принята к публикации 10.07.2020 г.

Статья посвящена особенностям проведения кислородных (O<sub>2</sub>) измерений в биологических средах (культивационные среды, реакционные среды, среды для изолированных клеточных и субклеточных структур) и иных сложносоставных средах амперометрическим методом с помощью электродов Кларка. А именно, рассмотрен вопрос о влиянии качественного и количественного состава жидких сред на показания этих O<sub>2</sub>-датчиков. На примерах сахарозы, сорбитола, NaCl и фосфатного буфера показано, что, при условии постоянства содержания растворенного O<sub>2</sub>, увеличение содержания сопутствующих кислороду веществ в исследуемой среде приводит к усилению сигнала у находящегося в этой среде электрода Кларка. На основе полученных и литературных данных произведена оценка степени влияния качественного и количественного состава сред на показания электродов Кларка. В свою очередь, само это влияние объяснено тем, что электроды Кларка в действительности измеряют активность растворенного O<sub>2</sub>, которая обычно возрастает при увеличении содержания сопутствующих кислороду веществ. Поскольку электроды Кларка измеряют активность, а не истинное содержание O<sub>2</sub> в среде, и поскольку соотношение между активностью и истинным содержанием O<sub>2</sub> часто неизвестно, в статье рассмотрен также вопрос о калибровке электродов Кларка. Отмечено, что использованные в настоящей работе способы добавления известного количества молекул O<sub>2</sub> в жидкие среды (посредством реакции Хилла, каталазной реакции или впрыскивания насыщенной чистым O<sub>2</sub> микропорции воды) для демонстрации влияния состава среды на показания электрода Кларка могут быть применены для калибровки электродов Кларка в единицах истинного содержания O<sub>2</sub> и, таким образом, могут быть использованы для учета влияния сред на показания этих O<sub>2</sub>-датчиков. Высказано мнение, что, благодаря почти безграничным возможностям применения и своим другим достоинствам, калибровка, основанная на добавке в среду с электродом Кларка O<sub>2</sub>-насыщенной микропорции воды или, при необходимости, O<sub>2</sub>-насыщенной микропорции другой жидкости, является во всех смыслах самым выгодным способом калибровки. Можно ожидать, что приобщение данного способа калибровки к другим, уже известным способам калибровки и введение его в исследовательский обиход позволит во многих затруднительных случаях сделать измерения электродами Кларка более точными.

**Ключевые слова:** электрод Кларка, применение, калибровка, содержание кислорода, активность кислорода

**DOI:** 10.31857/S0015330321030039

### ВВЕДЕНИЕ

Кислородные измерения (O<sub>2</sub>-измерения) являются важной и часто необходимой частью большого числа биологических исследований. Чаще всего при проведении биологических исследований O<sub>2</sub>-измерения производят амперометрическим методом с помощью электродов Кларка (электрохимические O<sub>2</sub>-измерительные устройства, у которых анод и катод защищены от окружающей среды O<sub>2</sub>-проницаемой мембраной) [1–6]. Особенность O<sub>2</sub>-из-

мерений в биологических исследованиях состоит в том, что их обычно производят в богатых по составу биологических средах, оказывающих по этой причине заметное влияние на активность растворенных в них молекул O<sub>2</sub>. Между тем известно, что электроды Кларка и родственные им гальванические O<sub>2</sub>-датчики измеряют как раз активность, а не истинное содержание растворенных в жидких средах молекул O<sub>2</sub> [2–4, 6–10]. Последнее было показано на примере среды для изолированных хлоропластов, а также на примерах растворов, содержащих NaCl, моносахариды, дисахариды, длинно-цепочечные спирты, пиро-

**Сокращения:** ФЦ – феррицианид калия.

фосфатный буфер [2–4, 6, 7, 10, 11]. Если отмеченную выше особенность электродов Кларка не учитывать и представлять результаты  $O_2$ -измерений этими устройствами в количественном виде, то представленные результаты будут тем ошибочнее, чем больше отличаются друг от друга значения видимого содержания  $O_2$  (активности  $O_2$ ) и истинного содержания  $O_2$  в среде при проведении  $O_2$ -измерений электродом Кларка.

Поскольку электроды Кларка получили очень широкое распространение в качестве инструмента для  $O_2$ -измерений [12, 13], отрицательные последствия от ошибок при их использовании могут быть значительными. К ошибкам, совершаемым при использовании электродов Кларка, можно отнести также вольное или невольное пренебрежение отмеченным выше влиянием качественного и количественного состава жидких сред на показания этих  $O_2$ -измерительных устройств. Указанная методическая ошибка совершается по трем причинам: (1) из-за незнания вопроса о влиянии сред на показания электродов Кларка вообще, (2) из-за незнания того, каким образом можно учесть влияние некоторых сред на показания электрода Кларка при знании вопроса в целом, (3) из-за невозможности учесть влияние некоторых сред на показания электрода Кларка с нужной точностью в принципе. Вопросу влияния состава жидких сред на показания электродов Кларка и, таким образом, вопросу повышения точности проводимых электродами Кларка измерений через устранение причин их неправильного использования и посвящена настоящая статья.

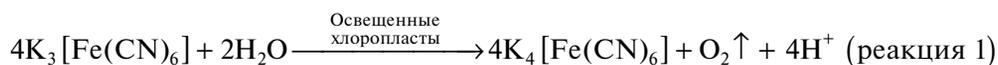
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован самодельный электрод Кларка классического типа с платиновым катодом (рабочий электрод; диаметр 4.0 мм) и серебряным анодом (вспомогательный Ag/AgCl электрод). Корпус электрода Кларка представлял собой полый эбонитовый цилиндр (внутренний диаметр 6.0 мм, внешний диаметр 9.0 мм). Внутренняя часть корпуса электрода Кларка с находящимися в ней рабочим электродом, вспомога-

тельными электродом и электролитом (0.1 М KCl) была отделена от окружающей среды тефлоновой мембраной (толщина 15 мкм, рабочая площадь мембраны 28.3 мм<sup>2</sup>). Плато вольт-амперной кривой у электрода Кларка при его нахождении в воде, насыщенной атмосферным воздухом, начиналось и заканчивалось при -500 мВ и -800 мВ, соответственно. При рабочем напряжении, соответствующем диффузионному току и 25°C, сигнал погруженного в воду электрода Кларка линейно зависел от содержания  $O_2$  в пределах 0–100% насыщения воды кислородом. Для проведения  $O_2$ -измерений электрод Кларка подсоединяли к полярографу LP7 (“Laboratorni Pristroje”, Чехия), позволяющего переводить датчик в рабочее состояние и записывать производимый им сигнал.

$O_2$ -измерения проводили в стеклянной цилиндрической термостатируемой  $O_2$ -измерительной ячейке (объем 3.8 мл). Электрод Кларка был вставлен в ячейку с боковой стороны. Заполнение и опорожнение ячейки производили через отверстие в ее верхней части. Для перевода ячейки в рабочее положение это отверстие закрывали стеклянным запорным приспособлением, имеющим канал (диаметр 0.8 мм, длина 20.0 мм) для ввода добавок внутрь запорной  $O_2$ -измерительной ячейки. Содержимое  $O_2$ -измерительной ячейки перемешивали с помощью магнитной мешалки, на которой ячейка располагалась.

**Изменение содержания  $O_2$  в среде с помощью реакции Хилла.** Реакцией Хилла называется перенос электронов от воды к акцептору электронов в освещенных изолированных хлоропластах, который сопровождается разложением воды и образованием из нее молекул  $O_2$ . Одним из часто используемых акцепторов электронов в реакции Хилла является феррицианид калия (ФЦ). Реакция Хилла с ФЦ была использована для точного изменения содержания  $O_2$  в среде в связи с ее протеканием до полного исчерпания ФЦ и строгим соответствием количества образованного  $O_2$  количеству восстановленного хлоропластами ФЦ (реакция 1).



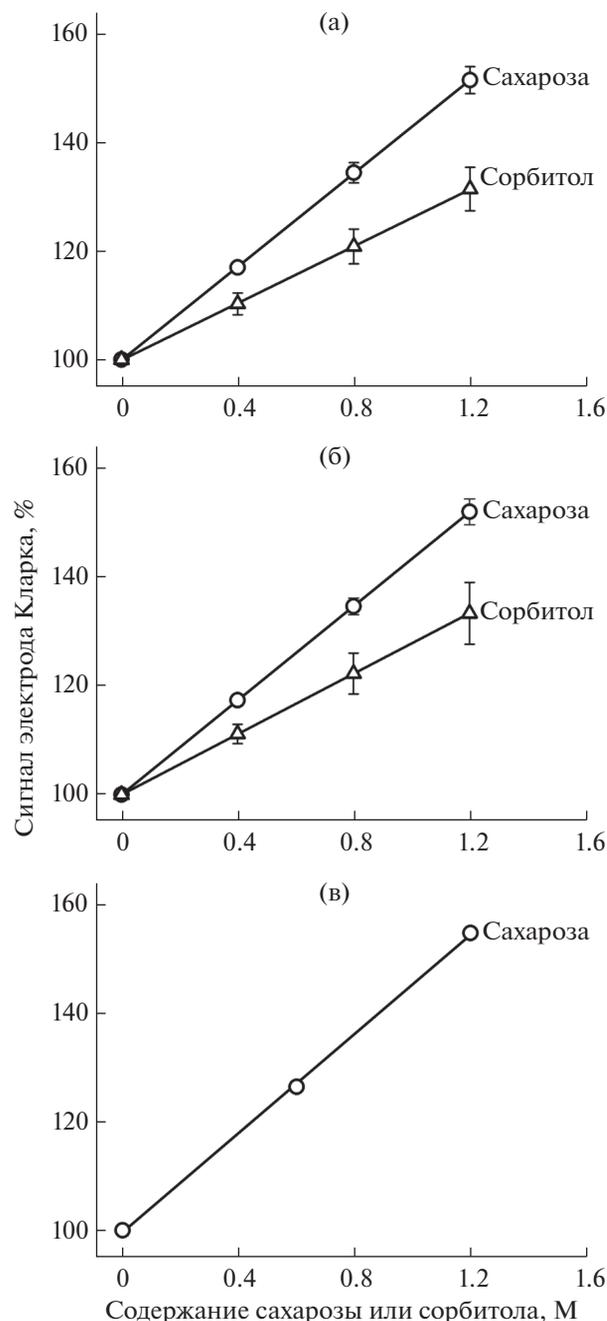
ФЦ-восстанавливающие хлоропласты для проведения реакции Хилла извлекали из листьев гороха и хранили при плотности 1.8–2.5 мг Хл/мл [14]. Чтобы при проведении  $O_2$ -измерений весь добавленный к хлоропластам ФЦ расходовался только на реакцию Хилла и не тратился, в том числе и на окисление оставшихся в препарате хлоропластов эндогенных растительных восста-

новителей, хлоропласты при извлечении тщательно промывали. ФЦ-зависимое выделение  $O_2$  хлоропластами измеряли при атмосферном содержании растворенного  $O_2$ , 25°C и при плотности хлоропластов 30–45 мкг Хл/мл. Реакцию Хилла в изолированных хлоропластах производили в реакционной среде, содержащей сахарозу (0–1.2 М) или сорбитол (0–1.2 М), NaCl (50.0 мМ), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

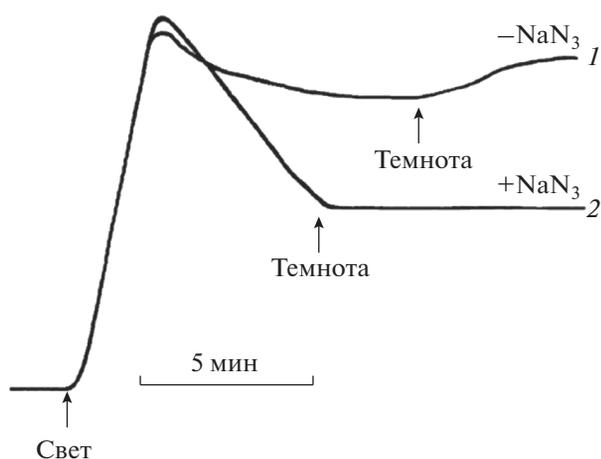
**Рис. 1.** Зависимость сигнала электрода Кларка, производимого добавкой одного и того же количества молекул O<sub>2</sub> в среду в O<sub>2</sub>-измерительную ячейку, от содержания сахарозы и сорбитола в этой среде. (а) Испытательная среда – суспензия изолированных хлоропластов гороха с разным содержанием сахарозы и сорбитола. Нормированную добавку O<sub>2</sub> в среду (добавляли 97.9 нмоль O<sub>2</sub>/мл среды) делали при помощи реакции Хилла в хлоропластах с одним и тем же количеством ФЦ (391.7 нмоль ФЦ/мл среды). Представлены средние значения результатов 9 опытов с сахарозой и 4 опытов с сорбитолом с доверительным интервалом 95%. (б) Испытательная среда – раствор каталазы и 50 мМ фосфатного буфера с разным содержанием сахарозы и сорбитола. Нормированную добавку O<sub>2</sub> в среду (в зависимости от опыта добавляли 194.3–388.2 нмоль O<sub>2</sub>/мл среды) делали при помощи каталазной реакции с одним и тем же количеством H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (в зависимости от опыта 388.5–776.3 нмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мл среды). Представлены средние значения результатов 4 опытов с сахарозой и 3 опытов с сорбитолом с доверительным интервалом 95%. (в) Испытательная среда – вода с разным содержанием сахарозы. Нормированную добавку O<sub>2</sub> в среду (32.6 нмоль O<sub>2</sub>/мл среды) делали посредством впрыскивания в нее одного и того же количества O<sub>2</sub>-насыщенной воды (26.3 мкл/мл среды). Представлены средние значения результатов 2 опытов, в каждом из которых измерения сделаны в 4–7 кратной повторности. Во всех случаях ответ электрода Кларка на добавку O<sub>2</sub> при нулевом содержании сахарозы и сорбитола принят за 100%.

(6.0 мМ), MgCl<sub>2</sub> (2.0 мМ), трис-НСl (10.0 мМ), АДФ (1.0 мМ) при рН 7.9 (рис. 1а) или рН 8.0 (рис. 2). При проведении опытов в реакционной среде изменяли содержание только того вещества, влияние которого на показания электрода Кларка изучали. Содержание других компонентов среды при этом оставалось неизменным. В O<sub>2</sub>-измерительную ячейку вносили 3.75 мл реакционной среды и 50 мкл хлоропластов, после чего ячейку закрывали и начинали запись показаний электрода Кларка. Вначале записывали изменение содержания O<sub>2</sub> в суспензии хлоропластов в темноте. Затем в закрытую ячейку к хлоропластам добавляли 30 мкл водного раствора ФЦ (50 мМ) и записывали увеличение содержания O<sub>2</sub> (ΔO<sub>2</sub>) в суспензии на свету вплоть до исчерпания всего добавленного ФЦ (рис. 2). Для уверенности, что при проведении O<sub>2</sub>-измерений добавленный в суспензию хлоропластов ФЦ не расходуется на окисление возможно не до конца удаленных промывкой хлоропластов эндогенных растительных восстановителей, на одной и той же суспензии хлоропластов делали 2–3 измерения ΔO<sub>2</sub>. При определении ΔO<sub>2</sub> ФЦ добавляли в закрытую ячейку микрошприцом через предназначенный для этого канал (см. выше).

Обычно, благодаря хорошей промывке хлоропластов при их извлечении из листьев, величины ΔO<sub>2</sub> после первой и второй добавок ФЦ были одинаковыми. В этом случае, обе величины ΔO<sub>2</sub> использовали для вычисления среднего значения ΔO<sub>2</sub>. В тех случаях, когда величина ΔO<sub>2</sub> после пер-



вой добавки ФЦ из-за постороннего расходования ФЦ была постоянно меньше, чем величина ΔO<sub>2</sub> после второй и третьей добавок ФЦ, значение первого ΔO<sub>2</sub> при вычислении среднего значения ΔO<sub>2</sub> не учитывали. При проведении измерений исходили из допущения, что поглощение O<sub>2</sub> хлоропластами и электродом Кларка в темноте до начала реакции Хилла продолжается с той же скоростью на свету в ходе реакции Хилла. Поэтому, при вычислении окончательного ΔO<sub>2</sub> к показанному прибором ΔO<sub>2</sub> прибавляли количество O<sub>2</sub>, сум-



**Рис. 2.** Приборные записи изменения содержания  $O_2$  в суспензии изолированных хлоропластов гороха до и после добавления к ним ФЦ. Записи (типичный результат) произведены при 0.4 М содержании сахарозы в суспензии хлоропластов плотностью 14.4 мкг Хл/мл в отсутствие и в присутствии  $NaN_3$  (0.5 мМ). ФЦ добавлен к хлоропластам в конечной концентрации 259.07 нмоль/мл непосредственно перед их освещением белым светом мощностью 250 Вт/м<sup>2</sup>.

Примечание к рисунку: демонстрируемый кривыми 1 и 2 переход хлоропластов на свету от выделения  $O_2$  к поглощению  $O_2$  обусловлен исчерпанием добавленного к хлоропластам ФЦ и переключением хлоропластов с нециклического транспорта электронов (от  $H_2O$  к ФЦ) на псевдоциклический транспорт электронов (от  $H_2O$  к  $O_2$  с образованием  $H_2O_2$ ), называемый также реакцией Мейлера. Сильное поглощение  $O_2$  хлоропластами на свету в присутствии ингибитора каталазы азидата натрия,  $NaN_3$ , (кривая 2) обусловлено тем, что образованная  $H_2O_2$  без существенных изменений накапливается в хлоропластной среде. Более слабое поглощение  $O_2$  хлоропластами на свету в отсутствие  $NaN_3$  (кривая 1) является следствием газообмена  $O_2$  в суспензии хлоропластов в двух противоположных направлениях: поглощение  $O_2$  в реакции Мейлера с образованием  $H_2O_2$  и выделение  $O_2$  в каталазной реакции из образованной в реакции Мейлера  $H_2O_2$  (реакция 2). Следующее за выключением света довольно быстрое обратное повышение содержания  $O_2$  в среде в отсутствие  $NaN_3$  до соответствующего концу реакции Хилла уровня (кривая 1) также обусловлено каталазным разложением накопившейся в суспензии хлоропластов за счет реакции Мейлера  $H_2O_2$  на  $O_2$  и  $H_2O$ .

марно поглощенное хлоропластами и электродом Кларка за время измерения  $\Delta O_2$ .

Для освещения хлоропластов использовали диапроектор с лампой накаливания мощностью 400 Вт. Данные, представленные на рис. 1а, получены на красном свету интенсивностью 21 Вт/м<sup>2</sup> или 45 Вт/м<sup>2</sup>. Данные, представленные на рис. 2, получены на белом свету интенсивностью 250 Вт/м<sup>2</sup>. Интенсивность и качество падающего на хлоропласты света изменяли при помощи стеклянных нейтральных и красного светофильтров. Интенсивности падающего на хлоропласты света измеряли при помощи термостолбика Козырева.

**Изменение содержания  $O_2$  в среде с помощью каталазной реакции.** Каталазная реакция – реакция разложения перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) на  $O_2$  и  $H_2O$  ферментом каталазой ( $H_2O_2$ :  $H_2O_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6). Каталазная реакция была использована для точного изменения содержания  $O_2$  в водной среде в связи с тем, что каталаза осуществляет реакцию разложения  $H_2O_2$  на  $O_2$  и  $H_2O$  с высокой скоростью, до полного исчерпания  $H_2O_2$  и в строгом соответствии количества добавленных к каталазе молекул  $H_2O_2$  и количества образовавшихся из  $H_2O_2$  молекул  $O_2$  (реакция 2).



Каталазную реакцию осуществляли в водной среде, содержащей сахарозу (0–1.2 М) или сорбитол (0–1.2 М),  $NaN_2PO_4$ -КОН буфер (5 мМ или 50 мМ, рН 7.0) и каталазу (80.0 мкг/мл) при 25°C. При проведении опытов в среде изменяли содержание только того вещества, влияние которого на показания электрода Кларка изучали. Содержание других компонентов среды при этом оставалось неизменным. Среда содержала 50 мМ  $NaN_2PO_4$ -КОН буфера при получении данных, представленных на рис. 1, и 5 мМ или 50 мМ  $NaN_2PO_4$ -КОН буфера при получении данных, представленных в табл. 1. Раствор  $H_2O_2$  для каталазной реакции приготавливали из аптечного раствора  $H_2O_2$  путем разведения последнего дистиллированной водой. Точное содержание  $H_2O_2$  в добавляемом в  $O_2$ -измерительную ячейку растворе  $H_2O_2$  определяли фотометрически с использованием молярного коэффициента светопоглощения  $\epsilon_{240 \text{ nm}} = 43.6/(\text{М см})$ . Для проведения каталазной реакции в  $O_2$ -измерительную ячейку вносили 3.79 мл реакционной среды, ячейку закрывали и ждали наступления устойчивости в показаниях электрода Кларка. Затем в закрытую ячейку добавляли микрошприцом в зависимости от опыта 10–20 мкл раствора  $H_2O_2$  (74–295 мМ) и записывали обусловленное каталазной реакцией увеличение содержания  $O_2$  в ячейке ( $\Delta O_2$ ). При вычислении окончательного  $\Delta O_2$  к показанному прибором  $\Delta O_2$  прибавляли количество  $O_2$ , поглощенное электродом Кларка за время измерения  $\Delta O_2$ .

**Изменение содержания  $O_2$  в среде с помощью  $O_2$ -насыщенной микродобавки воды.**  $O_2$ -насыщенную воду приготавливали в стеклянном сосуде объемом 14 мл и диаметром 20 мм. Для этого сосуд заполняли дистиллированной водой (~9 мл) и закупоривали резиновой пенициллиновой пробкой. Чтобы сосуд случайно не открылся, пробку прижимали к сосуду винтовым прижимным устройством. Через пробку вводили две одинаковые шприцевые иглы для продувки воды в сосуде  $O_2$ -газом. Через одну иглу, конец которой опускали при-

**Таблица 1.** Влияние NaCl, сахарозы и фосфатного буфера на показания электрода Кларка

№ опыта	Содержание в среде изменяемых веществ*	Ответ электрода Кларка на нормированную добавку O <sub>2</sub> , %**
1	5 мМ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH	100.0
	50 мМ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH	107.1
2	0 мМ сахарозы + 50 мМ NaCl	100.0
	0 мМ сахарозы + 200 мМ NaCl	104.2
	200 мМ сахарозы + 50 мМ NaCl	108.7

Примечание. \* Нормированное увеличение содержания O<sub>2</sub> в средах производили посредством разложения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> каталазой в опыте 1 и посредством реакции Хилла в изолированных хлоропластах в опыте 2, как описано в разделе “Материалы и методы”. В таблице указаны только те компоненты сред, содержание которых изменялось и, соответственно, которые изменяли показания электрода Кларка.

\*\* Приведены данные двух разных единичных опытов в виде средних значений 4–7 измерений в опыте 1 и 6–8 измерений в опыте 2. При определении ответа электрода Кларка содержание O<sub>2</sub> в среде в O<sub>2</sub>-измерительной ячейке увеличивали на одно и то же количество молекул O<sub>2</sub>: 200.0 и 64.8 нмоль/мл в опытах 1 и 2, соответственно.

мерно на 2 см вглубь воды в сосуде, воду в сосуде для ее насыщения кислородом продували с умеренной (чтобы не вызвать повышения давления в сосуде) скоростью O<sub>2</sub>-газом из баллона со сжатым O<sub>2</sub>. Через вторую иглу, конец которой располагался в верхней газовой части сосуда, выходящий из воды газ уходил во внешнюю среду. Насыщение воды кислородом, как и собственно O<sub>2</sub>-измерения, производили при 25°C.

Для определения ответа электрода Кларка на добавку O<sub>2</sub> в виде O<sub>2</sub>-насыщенной воды, в O<sub>2</sub>-измерительную ячейку вносили 3.7 мл насыщенных воздухом дистиллированной воды или водного раствора сахарозы, ячейку закрывали и ждали наступления устойчивости в показаниях электрода Кларка. После этого из непрерывно продуваемого чистым O<sub>2</sub> сосудика через пробку в газовый микрошприц (“Hamilton Co”, Швейцария) размерно набирали 100 мкл O<sub>2</sub>-насыщенной воды, шприц из сосуда вынимали и набранную шприцем воду добавляли в закрытую O<sub>2</sub>-измерительную ячейку для записи ответа электрода Кларка (ΔO<sub>2</sub>) на добавленный вместе с водой O<sub>2</sub>. При вычислении окончательного значения ΔO<sub>2</sub> к показанному прибором ΔO<sub>2</sub> прибавляли количество O<sub>2</sub>, поглощенное электродом Кларка за время измерения ΔO<sub>2</sub>.

В работе, наряду с веществами отечественного производства, использовали вещества иностранного производства: трис (биохимический буфер для систем с низким содержанием металлов, “Koch-Light Laboratories Ltd”, Англия), каталазу из бычьей печени (“Sigma Chemical Co”, США), сорбитол (“Panreac Química SLU”, Испания) и АДФ (“Reanal”, Венгрия).

Статистические сведения приведены в подписях к рисункам и таблицам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены данные по влиянию растворенных в водных средах разного состава сахарозы и сорбитола на показания погруженного в эти среды электрода Кларка. При получении этих данных содержание O<sub>2</sub> в использованных средах изменяли тремя способами. Первый способ (рис. 1а) состоял в нормированном повышении содержания O<sub>2</sub> в среде посредством проведения реакции Хилла в изолированных хлоропластах с ФЦ, как акцептором электронов (см. “Материалы и методы”). Второй способ (рис. 1б) состоял в нормированном увеличении содержания O<sub>2</sub> в среде посредством проведения каталазной реакции (см. “Материалы и методы”). Третий способ (рис. 1в) состоял в нормированном повышении содержания O<sub>2</sub> в среде посредством добавки в нее микропорции воды, насыщенной чистым O<sub>2</sub> (см. “Материалы и методы”). Можно видеть, что, несмотря на постоянство количества добавляемого O<sub>2</sub> в среды с электродом Кларка, увеличение содержания сахарозы и сорбитола в этих средах с 0 до 1.2 М приводило к существенному линейно зависимому увеличению сигнала O<sub>2</sub>-датчика. Более того, несмотря на большую разнородность сред (суспензия хлоропластов (рис. 1а), среда для каталитической реакции (рис. 1б), просто водные растворы сахарозы (рис. 1в)), зависимости сигнала электрода Кларка от содержания сахарозы и сорбитола в средах для каждого из этих веществ в отдельности получились очень похожими. А именно, при увеличении содержания сахарозы и сорбитола в средах с 0 до 1.2 М сигнал электрода Кларка увеличивался на 52–56% и 32–34%, соответственно. Преобразование данных Robinson and Cooper [7] в графический вид показало, что сигнал электрода Кларка увеличивается линейным обра-

зом также и при увеличении содержания NaCl в водной среде снаружи O<sub>2</sub>-датчика с 0.5 до 5.43 М.

Хотя исследование влияния NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-КОН буфера и NaCl на показания электрода Кларка первоначально не входило в задачу настоящей работы, такое исследование со вспомогательной целью в ходе работы все же было проведено. Результаты этого исследования, которые следует рассматривать как приблизительные с точки зрения статистических требований, приведены в табл. 1. Можно видеть, что при увеличении содержания NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-КОН буфера в среде в O<sub>2</sub>-измерительной ячейке с 5 до 50 мМ (опыт №1) сигнал электрода Кларка увеличился на 7.1%, при увеличении содержания сахарозы с нуля до 200 мМ (опыт №2) сигнал увеличился на 8.7%, а при увеличении содержания NaCl с 50 до 200 мМ сигнал увеличился только на 4.2%. Что касается влияния NaCl на показания электрода Кларка, то его значение 4.2% в табл. 1 не очень существенно отличается от значения ~7%, полученного автором данной статьи для тех же концентраций NaCl при обработке данных Robinson and Cooper [7]. То же самое можно сказать о влиянии сахарозы. Данные в табл. 1 по влиянию сахарозы на сигнал электрода Кларка хорошо согласуются с данными, представленными на рис. 1. В обоих случаях сигнал электрода Кларка при 200 мМ сахарозы увеличился на ~9%.

Из данных, представленных на рис. 1 и в табл. 1, следует, что растворы, содержащие сахарозу, сорбитол, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-КОН буфер и NaCl в обычных для биологических исследований количествах, неравносильно, но при этом довольно существенно увеличивают сигнал электрода Кларка. О подобном действии реакционной среды для изолированных хлоропластов, а также растворов NaCl, моносахаридов, дисахаридов, длинноцепочечных спиртов, пирофосфатного буфера на показания электрода Кларка сообщалось ранее [2–4, 7, 10, 11]. Причина такого действия жидких биологических сред и простых химических растворов на сигнал электродов Кларка состоит в том, что данные O<sub>2</sub>-измерительные устройства измеряют активность растворенных в жидких средах молекул O<sub>2</sub>, значение которой возрастает при увеличении содержания в этих средах других веществ. Если данное явление при проведении количественных O<sub>2</sub>-измерений не учитывать, то результаты таких измерений получатся тем более ошибочными, чем сильнее находящиеся в среде вещества изменяют активность растворенного O<sub>2</sub>. Не учитывать влияние исследуемых сред на показания электродов Кларка можно только в трех одновременно выполняющихся случаях. Первое, когда значения видимого и истинного содержания O<sub>2</sub> в средах равны или почти равны друг другу, т.е. при проведении O<sub>2</sub>-измерений в средах, содержимое которых не влияет или слабо влияет на активность растворенного в этих средах O<sub>2</sub>.

Второе, когда в средах не содержатся вещества, способные изменять проницаемость мембраны электрода Кларка для O<sub>2</sub>. Третье, когда в средах не содержатся вещества, способные наряду с O<sub>2</sub> проникать внутрь электрода Кларка и взаимодействовать электрохимически или химически с анодом и/или катодом O<sub>2</sub>-датчика [6].

Поскольку растворимость, активность и диффузия O<sub>2</sub> в жидких средах часто непредсказуемо зависят от природы (электролиты, не электролиты, биологический материал, не биологические нерастворимые частицы), концентрации и физико-химического состояния компонентов среды [3, 8, 15–17], вопрос влияния жидких сред на показания электродов Кларка тесно связан с вопросом калибровки этих O<sub>2</sub>-датчиков. Правильно выбранный способ калибровки используемого электрода Кларка является залогом правильности произведенных этим датчиком количественных измерений O<sub>2</sub>. Правильный подход к калибровке электродов Кларка при проведении биологических исследований важен не только потому, что из-за насыщенности биологических сред веществами и биологическими объектами значения активности и истинного содержания растворенного в них O<sub>2</sub> заметно, а подчас сильно различаются. Он важен также потому, что точный состав биологических сред, а значит и растворимость в этих средах O<sub>2</sub>, часто не только неизвестны, но и изменяются прямо в ходе проведения O<sub>2</sub>-измерений (это может иметь место, например, при проведении измерений в природных условиях, в ферментируемых средах или в ходе культивирования растений, макро- и микроводорослей, грибов, бактерий). Важностью калибровки электродов Кларка для O<sub>2</sub>-измерений, трудностями, связанными с ее правильным проведением, и наличием препятствий для создания коммерческих стандартных калибровочных растворов O<sub>2</sub> [18] объясняется непрекращающийся поиск новых и как можно более простых и пригодных для всех или, по крайней мере, для большого количества случаев O<sub>2</sub>-измерений способов калибровки данных O<sub>2</sub>-измерительных устройств.

Несмотря на многообразие предложенных за время существования метода способов калибровки электродов Кларка (в общей сложности не менее двадцати трех разных по трудоемкости, стоимости и условиям применения способов), ни один из них не обладает полным набором таких необходимых для калибровочного дела качеств, как простота, точность, дешевизна, быстрота и достаточная универсальность с точки зрения разнообразия случаев O<sub>2</sub>-измерений. Значительные ограничения имеются и у самой широко применяемой калибровки электродов Кларка газонасыщающим способом (калибровка, основанная на насыще-

нии калибровочных сред газовыми смесями с разным содержанием O<sub>2</sub>) [3, 4, 8, 9, 19]. Чаще всего при калибровке электродов Кларка этим способом калибровочные среды насыщают разным количеством O<sub>2</sub> путем их продувки купленными или приготовленными собственными силами газовыми смесями. При этом содержание O<sub>2</sub> в насыщенных газовых смесях сред рассчитывают с использованием соответствующих справочных данных. Однако, из-за того, что растворимость, активность и диффузия O<sub>2</sub>, как уже было отмечено выше, во многих средах неизвестны, но хорошо известны для чистой воды, калибровку электродов Кларка газонасыщающим способом часто делают не в той среде, в которой измеряют O<sub>2</sub>, а в воде, нарушая, таким образом, главное правило калибровки: калибровать электрод Кларка в той среде и в тех условиях, в которых производят измерение O<sub>2</sub> [9, 19]. В итоге, в результате количественных измерений O<sub>2</sub> (например, измерения истинного содержания O<sub>2</sub> или скоростей газообмена O<sub>2</sub> в тех или иных средах) электродами Кларка вкрадывается ошибка, которая оказывается тем значительнее, чем значительнее активность O<sub>2</sub> в использованных для O<sub>2</sub>-измерений средах и в воде отличаются друг от друга. О размерах такой ошибки можно судить по литературным данным, показывающим, что различие между растворимостью O<sub>2</sub> в чистой воде и в суспензии изолированных митохондрий составляет 9–12%, а различия между растворимостью O<sub>2</sub> в чистой воде и микробиологических средах или различия между растворимостью O<sub>2</sub> в бродильных средах в начале и в конце процесса брожения составляют 5–41% [8, 20–24]. Размеры такой ошибки можно представить также исходя из литературных данных, показывающих, что ответ электрода Кларка на одно и то же количество добавленного O<sub>2</sub> в 50 мМ водном растворе пироглутамата [11] и обычной среде для изолированных хлоропластов [2] на 10–11% больше по сравнению с ответом в чистой воде. Наконец, возможные размеры этой ошибки позволяют представить приведенные на рис. 1 и в табл. 1 данные, а также расчеты, сделанные при подготовке настоящей статьи с использованием данных Robinson and Cooper [7]. Из этих расчетов следует, что ответ электрода Кларка на одно и то же количество добавленного O<sub>2</sub> становится примерно на 23% и 45% больше при увеличении концентрации NaCl в растворе на 0.5 и 1.0 М, соответственно. При большем увеличении содержания (1.0–6.0 М) растворенных веществ (KCl, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ответ электрода Кларка на добавку O<sub>2</sub> начинает различаться с ответом в воде или разбавленном растворе еще больше [4, 7]. К примеру, сигнал электрода Кларка на одну и ту же добавку O<sub>2</sub> в 5.43 М растворе NaCl становится на 228% больше,

чем в 0.5 М растворе NaCl [7]. Данное обстоятельство дало основание Delieu and Walker высказать мнение, что из-за трудности учета влияния состава исследуемых сред на показания электродов Кларка калибровку O<sub>2</sub>-датчиков обычно производят в чистой воде независимо от состава исследуемых сред, из-за чего в усредненном целом измерения электродом Кларка получаются с ошибкой ~10% [25]. Подобного мнения придерживаются и другие исследователи [23, 26].

Чтобы рассмотренные выше особенности метода не были причиной неверного определения истинного содержания O<sub>2</sub> в биологических средах, следует отказаться от калибровки O<sub>2</sub>-датчика в воде и независимо от выбранного способа калибровки калибровать его в используемых для O<sub>2</sub>-измерений средах. В этом случае, если выбор делается в пользу газонасыщающего способа калибровки, то прежде, чем его применить, придется удостовериться, что в справочниках или текущей литературе имеются проверенные данные по растворимости O<sub>2</sub> в той среде или тех средах, в которой/которых производятся O<sub>2</sub>-измерения и калибровка O<sub>2</sub>-датчика. Если таковых там нет, то растворимость O<sub>2</sub> в некоторых средах можно узнать путем вычислений, используя уравнения и модели, разработанные для расчетов растворимости O<sub>2</sub> в этих средах. При этом надо иметь в виду, что, во-первых, и тот и другой подходы к определению растворимости O<sub>2</sub> при калибровке электродов Кларка газонасыщающим способом ограничены средами определенного состава. Во-вторых, эти подходы далеко не всегда могут дать ту точность калибровки, которую ожидают от проводимых O<sub>2</sub>-измерений. В-третьих, при использовании этих подходов к определению растворимости O<sub>2</sub> следует учитывать, что биологический материал и некоторые используемые в биологических исследованиях вещества (например, гемоглобин- и миоглобин-содержащие структуры, белковые молекулы, клетки живых существ, короткоцепочечные спирты, перфторуглероды, LiF, LiNO<sub>3</sub>, NiNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, HNO<sub>3</sub>, NaBO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) могут оказывать необычное и даже обратное влияние, по сравнению с обычным влиянием, на растворимость и активность O<sub>2</sub> в жидкой среде [6, 15, 16].

В связи с тем, что, как было отмечено выше, у калибровки электродов Кларка газонасыщающим способом имеются значительные ограничения в применении, особое значение приобретают способы, позволяющие, в отличие от газонасыщающего способа, калибровать электроды Кларка в единицах истинного содержания O<sub>2</sub> независимо от состава калибровочной среды. Существенно, что все три использованные в настоящей работе способа изменения содержания O<sub>2</sub> в жидкой среде (рис. 1) могут быть применены как раз для такого рода ка-

**Таблица 2.** Поглощение  $O_2$  изолированными хлоропластами гороха в отсутствие феррицианида

Содержание сахарозы/сорбитола в суспензии хлоропластов	Поглощение $O_2$ в темноте*, мкмоль/(мг Хл ч)	Поглощение $O_2$ на свету**, мкмоль/(мг Хл ч)
0.0 М сахарозы	$0.4 \pm 0.1$	$7.1 \pm 0.2$
0.8 М сахарозы	$0.4 \pm 0.2$	$7.8 \pm 0.5$
1.2 М сахарозы	$0.5 \pm 0.2$	$6.1 \pm 0.8$
0.6 М сорбитола	$0.7 \pm 0.3$	$7.6 \pm 0.5$
1.2 М сорбитола	$0.4 \pm 0.2$	$8.3 \pm 0.3$

Примечание. В таблице приведены средние значения результатов трех опытов и их стандартная ошибка. В каждом опыте измерения сделаны в 3–5 кратной повторности. Плотность хлоропластов в опытах составляла 32–38 мкг Хл/мл.

\* Измерения сделаны сразу после добавления хлоропластов в  $O_2$ -измерительную ячейку.

\*\* Измерения сделаны на красном свете интенсивностью 45 Вт/м<sup>2</sup> после остановки реакции Хилла из-за исчерпания феррицианида. Представлены начальные, т.е. наибольшие (как показывает кривая 1 на рис. 2, поглощение  $O_2$  хлоропластами после исчерпания феррицианида уменьшалось во времени) скорости поглощения  $O_2$ .

либровки. Возможность использования двух из этих трех способов, “хлоропластного” и “каталазного” (рис. 1а, 1б), в таком качестве уже была высказана и опробована ранее [2, 11, 27, 28]. Оценивая степень применимости всех трех способов изменения содержания  $O_2$  в жидкой среде, как калибровочных способов, приходится признать, что два последних способа, “хлоропластный” и “каталазный”, не могут иметь широкого применения. Это связано с тем, что и тот и другой способ работоспособны только в тех средах и условиях, в которых хлоропласты и каталаза сохраняют свою живучесть. При этом применимость первого способа гораздо меньше по сравнению со вторым способом по причине того, что изолированные хлоропласты гораздо менее доступны для использования и более требовательны к условиям измерений, чем каталаза. Слабым местом “хлоропластного” способа калибровки является также то, что изолированные хлоропласты способны не только выделять, но и поглощать  $O_2$ . Причем, как показывают данные, представленные на рис. 2 и в табл. 2, хлоропласты поглощают  $O_2$  как в темноте, так в отсутствии ФЦ и на свету. Если вдруг используемые хлоропласты поглощают  $O_2$  на свету не только в отсутствии, но и в присутствии ФЦ, пусть даже с небольшой скоростью, то это плохо скажется на точности производимой с их помощью калибровки электродов Кларка. В связи с этим, поскольку  $O_2$ -поглощающая способность у разных препаратов хлоропластов может быть в зависимости от метода их получения разной, использовать имеющиеся хлоропласты для точной калибровки электродов Кларка желательно лишь после проверки их на пригодность для такого точного применения. В добавление к отмеченной выше особенности, еще одной неудобной особенностью калибровки электродов Кларка “хлоропластным” способом является то, что она требует предпринимать меры (см. раздел “Материалы

и методы”), предотвращающие взаимодействие ФЦ в суспензии хлоропластов с другими, чем вода, донорами электронов. Что касается калибровки электродов Кларка каталазным способом, то и у этой калибровки есть свои освещенные в литературе “подводные камни” и тонкости применения [27–30].

Что касается третьего способа изменения содержания  $O_2$  в жидкой среде, состоящего из добавления в среду нужного количества  $O_2$  в виде микропорции  $O_2$ -насыщенной воды (рис. 1в) или, в случае необходимости, микропорции другой  $O_2$ -насыщенной жидкости, то он, как калибровочный способ, очень выгодно отличается не только от двух других примененных в настоящей работе способов, но, по-видимому, и от всех вообще описанных к настоящему времени в литературе способов калибровки. Это связано с тем, что, во-первых, калибровка таким способом сравнима по простоте, доступности и точности с упомянутой выше широко применяемой калибровкой газонасыщающим способом. Во-вторых, у этого способа калибровки почти безграничные возможности применения. В-третьих, ошибка  $O_2$ -измерений, связанная с изменением состава и свойств калибровочных сред, при таком способе калибровки электродов Кларка незначительна, поскольку само изменение этих сред под действием микродобавлений незначительно. Так, например, в случае, представленном на рис. 1в, объем добавляемой  $O_2$ -насыщенной воды составлял всего 2.5% от общего объема среды в  $O_2$ -измерительной ячейке. Но даже это незначительное количество добавляемой  $O_2$ -насыщенной воды могло быть, учитывая возможность усиления сигнала использованной в настоящей работе  $O_2$ -измерительной установкой, многократно уменьшено (по крайней мере, в 30 раз) без значительного ухудшения надежности измерений электродом Кларка. Кроме того, значительно увеличить сигнал и, следовательно, значительно

уменьшить количество добавляемой O<sub>2</sub>-насыщенной воды в опытах, представленных на рис. 1в, можно было также за счет замены у электрода Кларка использованной мембраны на более O<sub>2</sub>-проницаемую мембрану, т.е. за счет увеличения чувствительности самого O<sub>2</sub>-измерительного устройства.

Таким образом, завершая рассмотрение вопроса об особенностях применения электродов Кларка в биологических исследованиях, представляется полезным кратко повторить ключевое положение изложенного материала. Оно состоит в том, что, поскольку электроды Кларка измеряют активность, а не истинное содержание растворенного O<sub>2</sub>, показания этих измерительных устройств, как и активность O<sub>2</sub>, зависят не только от содержания O<sub>2</sub> в исследуемых средах, но также от качественного и количественного состава исследуемых сред в целом. Данное обстоятельство может вызвать затруднения в O<sub>2</sub>-измерениях либо сделать O<sub>2</sub>-измерения неправильными соответственно в тех случаях, когда соотношение между концентрацией и активностью O<sub>2</sub> в исследуемых средах очень трудно или невозможно оценить, либо когда отмеченное выше свойство электродов Кларка ошибочно не учитывается. Тем не менее, как показывает, в том числе, и настоящее исследование, упомянутые затруднения и неопределенности при хорошем знании вопроса могут быть в подавляющем большинстве случаев успешно преодолены посредством правильного применения подходящего случаю способа калибровки используемого электрода Кларка.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Clark L.C.Jr.* Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions // *Trans. – Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 1956. V. 2. P. 41.
2. *Delieu T., Walker D.A.* An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts // *New Phytol.* 1972. V. 71. P. 201.
3. *Fatt I.* Polarographic Oxygen Sensor. Its Theory of Operation and Its Application in Biology, Medicine, and Technology. United States: CRC Press, Inc., 1976. 290 p.
4. *Hitchman M.L.* Measurement of Dissolved Oxygen. (Chemical analysis, V. 49). New York: John Wiley & Sons Inc., 1978. 255 p.
5. *Severinghaus J.W., Astrup P.B.* History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode // *Journal of Clinical Monitoring.* 1986. V. 2. P. 125.
6. *Бородин В.Б.* Полярография. Применение электродов Кларка для O<sub>2</sub>-измерений // *Ин-т фундаментальных пробл. биол. РАН, Пушино, Моск. обл. – Деп. в ВИНТИ* 18.11.2016, 2016. № 154-В2016. 56 с.
7. *Robinson J. and Cooper J.M.* Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode // *Anal. Biochem.* 1970. V. 33. P. 390.
8. *Beechey R.B., Ribbons D.W.* Oxygen electrode measurements // *Methods in Microbiology* / Eds. Norris J.R., Ribbons D.W. New York: Acad. Press, 1972. V. 6B. P. 25.
9. *Lee Y.H. and Tsao G.T.* Dissolved oxygen electrodes // *Advances in Biochemical Engineering (Book Series: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology)*. V. 13. Berlin/Heidelberg: Springer. 1979. P. 35.
10. *Hale J.M.* Factors influencing the stability of polarographic oxygen sensors // *Polarographic Oxygen Sensors: Aquatic and Physiological Applications* / Eds. Gnaiger E., Forstner H. New York: Springer-Verlag, 1983. P. 3.
11. *Dixon M. and Kleppe K.* D-amino acid oxidase. I. Dissociation and recombination of the holoenzyme // *Biochim. Biophys. Acta.* 1965. V. 96. P. 357.
12. *Ramamoorthy R., Dutta P.K., Akbar S.A.* Oxygen sensors: materials, methods, designs and applications // *J. Mater. Sci.* 2003. V. 38. P. 4271.
13. *Jones S.T., Heindel T.J.* A review of dissolved oxygen concentration measurement methods for biological fermentations // *Mechanical Engineering Conference Presentations, Papers, and Proceedings (2007 ASAE Annual Meeting)*. Paper number: 077117. Minneapolis, 2007. 15 p. [https://lib.dr.iastate.edu/me\\_conf/200](https://lib.dr.iastate.edu/me_conf/200)
14. *Borodin V.B.* The Kok effect in pea. Comparative study of electron transport in washed and unwashed chloroplasts // *Soviet Plant Physiology.* 1992. V. 39. P. 217.
15. *Baburin L.A., Shvinka J.E., Viesturs U.E.* Equilibrium oxygen concentration in fermentation fluids // *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1981. V. 13. P. 15.
16. *Ho C.S., Ju L.-K.* Effects of microorganisms on effective oxygen diffusion coefficients and solubilities in fermentation media // *Biotechnol. Bioeng.* 1988. V. 32. P. 313.
17. *Pourplanche C., Larreta-Garde V., and Thomas D.* Comparison of polarographic and chemical measurements of oxygen uptake in complex media: the example of lipoxygenase reaction // *Anal. Biochem.* 1991. V. 198. P. 160.
18. *Fisicaro P., Adriaens A., Ferrara E., Prenesti E.* Assessment of the uncertainty budget for the amperometric measurement of dissolved oxygen // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 597. P. 75.
19. *Hitchman M.L.* Calibration and accuracy of polarographic oxygen sensors // *Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications* / Eds. Gnaiger E., Forstner H. New York: Springer-Verlag, 1983. P. 18.
20. *Popović M., Niebelschütz H., Reuß M.* Oxygen solubilities in fermentation fluids // *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1979. V. 8. P. 1.
21. *Slininger P.J., Petroski R.J., Bothast R.J., Ladisch M.R. and Okos M.R.* Measurement of oxygen solubility in fermentation media: a colorimetric method // *Biotechnol. Bioeng.* 1989. V. 33. P. 578.
22. *Doran P.M.* Bioprocess Engineering Principles. New York: Acad. Press, 1995. 439 p.

23. Gros J.B., Dussap C.G., and Catté M. Estimation of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> solubility in microbial culture media // *Biotechnol. Prog.* 1999. V. 15. P. 923.
24. Vendruscolo F., Rossi M.J., Schmidell W., Ninow J.L. Determination of oxygen solubility in liquid media // *ISRN Chem. Eng.* 2012. V. 2012. 5 p. <https://doi.org/10.5402/2012/601458>
25. Delieu T., Walker D.A. Polarographic measurement of photosynthetic oxygen evolution by leaf discs // *New Phytol.* 1981. V. 89. P. 165.
26. Rasmussen H.N., Rasmussen U.F. Oxygen solubilities of media used in electrochemical respiration measurements // *Anal. Biochem.* 2003. V. 319. P. 105.
27. Wingo W.J. and Emerson G.M. Calibration of oxygen polarographs by catalase-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide // *Anal. Chem.* 1975. V. 47. P. 351.
28. Halbach S. Catalase activity measured with a micro oxygen electrode in a pressurized reaction vessel // *Anal. Biochem.* 1977. V. 80. P. 383.
29. Hickey C.W. Quantitative addition of dissolved oxygen to *in situ* benthic chamber systems by use of catalase and hydrogen peroxide // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. V. 49. P. 462.
30. Aebi H.E. Catalase *in vitro* // *Methods Enzymol.* 1984. V. 105. P. 121.