

Журналу 70 лет!



ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 71, номер 1, 2024

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Индукцированный бактериальным элиситором FLG22 эндоцитоз в иммунной реакции клеток корней *Arabidopsis thaliana*
Л. А. Халилова, А. С. Воронков 3
- Оценка способности клонов плюсовых деревьев *Picea abies* (L.) H. Karst. из среднетаежной подзоны Карелии к соматическому эмбриогенезу
Р. В. Игнатенко, О. В. Чирва, М. А. Ершова, Н. А. Галибина, И. А. Теслюк 14
- Возрастные и адаптивные изменения показателей про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания листьев зимне-зеленого травянистого растения *Ajuga reptans* L. в природных условиях таежной зоны
М. А. Шелякин, Е. В. Силина, Т. К. Головкин 22
- Характеристика нового гена монодегидроаскорбатредуктазы у кукурузы (*Zea mays* L.) и его роль в ответе на стрессы
М. А. Филюшин, Д. Х. Архестова, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова 34
- Предполагаемые молекулярные аспекты функционирования дегидрогеназы полуальдегида янтарной кислоты в листьях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при солевом стрессе
Д. Н. Федорин, А. С. Бородин, А. Т. Епринцев 45
- Адаптация галофитов литорали к условиям приморских территорий Белого моря: участие жирнокислотного состава липидов
Е. Ф. Марковская, А. А. Зорина, Е. Н. Гуляева, А. А. Стародубцева, А. А. Кособрюхов 51
- Влияние мелатонина и обезвоживания на уровень ПОЛ и дыхание зародышей семян гороха, рост проростков и окислительную активность митохондрий эпикотилей
И. П. Генерозова, С. В. Васильев, П. А. Буцанец, А. Г. Шугаев 59
- Устойчивость растений *Sisymbrium lipskyi* к цинку и их фиторемедиационный потенциал
И. В. Дроздова, И. Б. Калимова, А. И. Беляева, Г. А. Пожванов, Н. В. Алексеева-Попова 70
- Катионная пероксидаза сорго и ее участие в защите растения в условиях загрязнения
Е. В. Щербакова, Е. В. Дубровская, Н. Н. Позднякова, А. А. Галицкая, О. В. Турковская 81
- Фенольные соединения и биологическая активность экстрактов каллусов и нативных растений солодки
А. А. Ермошин, И. С. Киселёва, Б. А. Галишев, М. В. Улитко 91

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение бромкрезолового зеленого для спектрофотометрического определения содержания алкалоидов на примере руты душистой

А. И. Валиева, А. Н. Акулов

101

УДК 581.1

ИНДУЦИРОВАННЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ЭЛИСИТОРОМ FLG22 ЭНДОЦИТОЗ В ИММУННОЙ РЕАКЦИИ КЛЕТОК КОРНЕЙ *Arabidopsis thaliana*

© 2024 г. Л. А. Халилова^{а, *}, А. С. Воронков^а^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: lhalilova@mail.ru

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Разнообразные молекулы патогенного происхождения, такие как бактериальный флагеллин (flg22), распознаются растениями через рецепторы плазматической мембраны и индуцируют как местные, так и системные иммунные реакции. При этом везикулярный транспорт является ключевым в обеспечении быстрого и точного реагирования. При взаимодействии с патогенами, локализованными на поверхности клеток, иммунные рецепторы подвергаются эндоцитозу по общему эндосомальному пути. Какой из везикулярных путей патогены используют для проникновения в ткани и какое значение имеет в этом процессе flot1 остается не до конца изученным. Данное исследование посвящено влиянию биотических факторов стресса на иммунную реакцию растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа и его нокаут-мутанта *Atflot1ko*. Изучены процессы эндоцитоза под действием разных агентов: 1-нафталинлуксусной кислоты и метил-β-циклодекстрина. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии выявлены различия в ответных реакциях клеток на стресс, индуцированный flg22. Показано, что биотический стресс у нокаут-мутантов активирует секреторный путь (экзоцитоз), необходимый для защиты клеток от действия патогена на поверхности клетки, тогда как у растений дикого типа активируется эндоцитоз, направленный на перемещение патогена в вакуоль. Полученные данные показали, что обработка мутантов *Atflot1ko* бактериальным пептидом сохраняет активность работы комплекса Гольджи и способность этой структуры формировать ранние эндосомы, принимающие непосредственное участие в транспорте защитных белков к месту проникновения патогена.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, бактериальный пептид, биотический стресс, иммунный ответ, клатрин-зависимый эндоцитоз, патогены, рецепторы мембраны, флотилин, экзоцитоз, flg22

DOI: 10.31857/S0015330324010011, EDN: NWQHLL

ВВЕДЕНИЕ

Растения, как и все другие живые организмы, неразрывно связаны со средой обитания. Однако, в силу прикрепленного образа жизни, их зависимость от окружающей среды значительно выше, чем у подвижных форм, и они постоянно вынуждены приспосабливаться к ее изменениям. В природе растения постоянно подвержены комбинированному стрессу, который условно можно разделить на абиотическую и биотическую составляющие [1]. В настоящее время адаптация к абиотическим факторам среды изучена

значительно полнее, чем к биотическим, вследствие простоты модуляции воздействия отдельных абиотических стрессоров в лабораторных условиях [1]. Растительные организмы для изучения окружающей среды используют рецепторы своих клеток. Известно, что растения имеют врожденные поверхностные и внутриклеточные иммунные рецепторы, способные обнаруживать присутствие микробных патогенов и запускают защитные реакции для прекращения или ограничения их роста [2]. Таким образом, очевидно, что изучение механизмов рецепции и ответных реакций организма растений на биотические стрессоры является крайне важной задачей для оценки адаптационного потенциала растений в целом.

У растений представлено два основных типа везикулярного транспорта: 1) секреторный путь, который транспортирует вновь синтезированные

Сокращения: ЭР – эндоплазматический ретикулум; ПМ – плазматическая мембрана; ПП – переплазматическое пространство; ПЭ/МВТ – поздние эндосомы/мультивезикулярные тела; КЗЭ/КНЗЭ – клатрин зависимый и клатрин независимый эндоцитоз; РЭ – ранние эндосомы; КГ – комплекс Гольджи; ТГС – транс Гольджи сеть.

белки из эндоплазматического ретикулаума (ЭР) в плазматическую мембрану (ПМ) или переплазматическое пространство (ПП); 2) эндоцитарный путь (клатрин-зависимый и независимый), который перебрасывает поверхностно локализованные белки ПМ через ранние эндосомы, а также интернализирует груз в вакуоль через поздние эндосомы/мультивезикулярные тела (ПЭ/МВТ). Процесс мембранного трафика по обоим путям включает отпочковывание везикул от донорской мембраны и последующий транспорт, привязывание и слияние везикул с мембраной-мишенью [3]. Клатрин-опосредованный (зависимый) эндоцитозный путь (КЗЭ) является основным и наиболее изученным в клетках растений [4]. К клатриновому пути относится и рецептор-опосредованный эндоцитоз (РОЭ), который играет важную роль в развитии, росте и защите клеток от патогенов, регулируя уровни и распределение рецепторов клеточной поверхности [5–7], однако такой эндоцитоз у растений мало изучен. Другой, клатрин-независимый (КНЗЭ), путь эндоцитоза в клетках растений связан с рафтами (участками ПМ, обогащенными стеринами и сфинголипидами), которые включают в себя специфические мембранные белки, такие как флотилин 1 (Flot1) [8]. Известно, что абиотический стресс индуцирует КНЗЭ в клетках растений, и флотилины в составе микродоменов ПМ участвуют в образовании ранних эндосом на транс-стороне комплекса Гольджи (КГ) [8, 9]. Нами также было показано, что нокаут-мутация *flot1* в условиях абиотического стресса приводит к деформации КГ и, как следствие, к дефекту образования ранних эндосом в клетках корней *Arabidopsis thaliana* [10].

ПМ образует первичный интерфейс эукариотических клеток для обнаружения потенциально вторгающихся патогенов. Распознавание ассоциированных с микробами молекулярных паттернов (microbe-associated molecular patterns, MAMPs) на ее поверхности опосредуется рецепторами распознавания образов (pattern recognition receptors, PRRs) – важнейшими компонентами врожденной иммунной системы растений. Охарактеризован широкий спектр различных PRR для консервативных микробных паттернов, включая более 10 с известными лигандами [11, 12] *A. thaliana* широко используется в качестве модельной растительной системы для изучения взаимодействия растения с патогенами в целом. Яркими примерами трансмембранных рецепторных киназ являются иммунные рецепторы флагеллина 2 (FLS2). FLS2 представляет собой PRR, который обнаруживает консервативные молекулярные паттерны, связанные с микробами или патогенами (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) [13, 14], такими как грибковый хитин [15], флагеллин [16], липо-

полисахариды [17]. Когда рецепторный белок распознает одну такую микробную молекулу, активируется и образуется комплекс с другими белками – корецепторами. Затем белковый комплекс посылает сигнал в клетку, чтобы вызвать иммунный ответ. Flg22 представляет собой фрагмент бактериального флагеллина, который, связываясь с флагеллин-чувствительным рецептором 2 (FLS2) [18], индуцирует взаимодействие последнего с его корецептором – BRI1-ассоциированной киназой 1 (BAK1) [19, 20] и запускает эндоцитоз FLS2 [16]. В результате данных процессов активируется консорциум защитных механизмов, в том числе и иммунный ответ растений [19, 21]. FLS2 функционирует как важный рецептор клеточной поверхности в иммунитете растений против бактериальной инфекции и запускает защитные силы растений после стимуляции бактериальным флагеллином или производным от флагеллина пептидом flg22 [21]. Нарушение интернализации FLS2 коррелирует с измененными ответами flg22 [16, 19, 22]. FLS2-рецепторы ПМ постоянно подвергаются РОЭ и возвращаются обратно в плазмалемму через ранние эндосомы/транс Гольджи сети (ТГС) (секреторный путь) [23, 24]. Лиганд-активированные рецепторы сортируются в ТГС и транспортируются в поздние эндосомы/мультивезикулярные тела (ПЭ/МВТ) [16, 25, 26]. Деградация таких FLS2-эндосом происходит внутри вакуолей, поскольку убиквитинированные белки, удаляемые с ПМ путем эндоцитоза, сортируются в ТГС и отправляются в МВТ и далее в вакуоль для дальнейшей деградации [27, 28]. Таким образом, распознавание flg22 растениями и быстрый локальный иммунный ответ ослабляют рост бактерий и могут индуцировать системную устойчивость к последующей инфекции [29].

Цель работы – анализ изменений, происходящих в клетках корней растений *A. thaliana* в ответ на биотический стресс, индуцированный бактериальным пептидом flg22, и выявление участия флотилинов и белков микродоменов ПМ в иммунном ответе растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Работа выполнена на растениях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (ДТ) (экотип Col-0) и его нокаут-мутанте *Atflot1ko* (SALK_205125C). Данные о вставке и характеристика мутанта были опубликованы нами ранее [30]. Пятидневные проростки *A. thaliana* ДТ и *Atflot1ko* как для FM-окрашивания, так и для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) были выращены на агаризованной ½ МС-среде с 0.5% сахарозой при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха $70 \pm 5\%$, фотопериоде 16 ч/сут и интен-

сивности света 80 мкмоль квантов ФАР/м² с, полученного от люминесцентных ламп ЛБ-80 (“Philips”, Польша).

FM4-64 окрашивание. В ходе эксперимента 5-дневные проростки инкубировали в 1 мл жидкой ½ МС-среде (без 0.5% сахарозы, рН 5.8). Для изучения динамики поглощения FM4-64 через 5, 15, 30, 45, 60 мин отбирали растения для детекции сигнала маркера. В контрольном варианте опыта проростки инкубировали с эндоцитозным красителем FM4-64 (2 мкМ) при комнатной температуре в течение 1 ч. В опытном варианте в среду инкубации одновременно с красителем вносили 10 мкМ flg22 (GenScript, #RP19986, США). Через 1 ч проростки переносили на предметное стекло и визуализировали с помощью микроскопа Axio-Imager Z2 (“Carl Zeiss”, Германия). Изображения получали с помощью монохромной высокочувствительной камеры AxioCamMRm (“Carl Zeiss”, Германия) в программе AxioVision 4.8. Флуоресценцию FM4-64 (красный псевдоцвет) детектировали, используя наборы фильтров № 14 (λ_{ex} 510–560 нм, λ_{em} > 590 нм; “Carl Zeiss”, Германия). Средняя интенсивность пикселей цитозольной стороны клеток, исключая плазматическую мембрану, были измерены с помощью программы ZEN Blue (“Carl Zeiss”, Германия). Для анализа использовали не менее 50 снимков в каждом варианте опыта.

Обработка корней НУК и МВЦД. 5-дневные проростки в течение 30 мин инкубировали в 1 мл жидкой ½ МС-среде (без 0.5% сахарозы, рН 5.8) с добавлением 100 мкМ НУК (“Sigma”, #N1641, Великобритания). Далее корни переносили в инкубирующий раствор с добавлением 2 мкМ FM4-64 и 10 мкМ flg22 при комнатной температуре и продолжали инкубацию еще 60 мин. При одновременной предобработке проростков НУК и МВЦД в раствор ½ МС-среды добавляли 100 мкМ НУК и 10 мМ МВЦД (“Sigma”, #128446-36-6, Китай). Далее все так же, как при обработке НУК. Обработка изображений была такая же, как при окрашивании FM4-64.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Изучение ультраструктуры клеток корней проростков *A. thaliana* ДТ и *Atflot1ko* проводили с помощью ТЭМ. Образцы подготавливали в соответствии со стандартной методикой [9]. Кусочки корней (2–3 мм) были вырезаны на расстоянии 1–2 мм от кончика корня. Образцы предварительно инкубировали в 10 мкМ flg22 в течение 1 ч и далее фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида в течение 3 ч с постфиксацией в 1% OsO₄ при 4°C в течение суток. Фиксирующие растворы готовили на основе 0.05 М какодилатного буфера, рН 7.2. После фиксации образцы обезвоживали в спиртах (30 и 40% – 2 раза по 15 мин; 50 и 60% – 2 раза по 30 мин; 70% – на ночь при 4°C). На следующий день образцы пе-

реносили в 96% этанол – 1 ч; 100% этанол : 100% ацетон – 1 : 1 (об/об) – 1 ч; 100% ацетон – 1 ч и далее в смесь эпоксидной смолы (“Fluka”, cat. № 2920114, Германия) и ацетона в соотношении 1 : 8, 1 : 4, 1 : 1 (об/об). После полимеризации образцов с помощью ультрамикротомы Om U3 (“Reihert”, Австрия) были получены ультратонкие срезы. Для просмотра в ТЭМ LIBRA 120 (“Carl Zeiss”, Германия) срезы помещали на сетки и контрастировали 1% уранилацетатом.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали факторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием HSD для неравных выборок в программе STATISTICA10 (StatSoft). На графиках представлены средние значения и их стандартные отклонения, разными буквами указаны достоверно отличающиеся величины при $P < 0.05$ или 0.001.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика поглощения FM4-64. Чтобы получить общее представление об участии флотилинов в иммунном ответе растений, мы исследовали эндоцитоз в клетках корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana* ДТ и его нокаут-мутанта (*Atflot1ko*).

Известно, что в процессе эндоцитоза FM4-64 интернализуется в ПМ клетки. На рис. 1 показана динамика поглощения зонда клетками корней в зоне растяжения у растений *A. thaliana* ДТ и *Atflot1ko*. Ранее нами было продемонстрировано, что в исследуемой зоне корней у ДТ и нокаут-мутанта в условиях засоления (100 мМ NaCl) через 30 мин инкубации проростков в растворе FM4-64 интенсивность флуоресценции у растений нокаут-мутанта была выше, чем у ДТ, в 2 раза [10].

В данной работе 5-дневные проростки исследуемых линий растений подвергались действию биотического фактора стресса. Растения были предобработаны бактериальным пептидом flg22 в течение 1 ч, и затем мы оценивали динамику поглощения и сигнал флуоресценции маркера клетками корня. Полученные результаты показали, что интенсивность FM4-64 у нокаут-мутанта через 1 ч после обработки пептидом сохранялась высокой и была более чем в 2 раза выше, чем у ДТ (рис. 1; 2а, г). При этом максимум флуоресценции эндоцитозного маркера приходился на 30 мин, как и при действии абиотического стресса. Динамика поглощения FM4-64 клетками корней показала, что интенсивность флуоресценции зонда в клетках нокаут-мутанта сохранялась высокой на всем промежутке времени по сравнению с ДТ.

Для изучения роли флотилинов в иммунном ответе растений мы проанализировали flg22-ин-

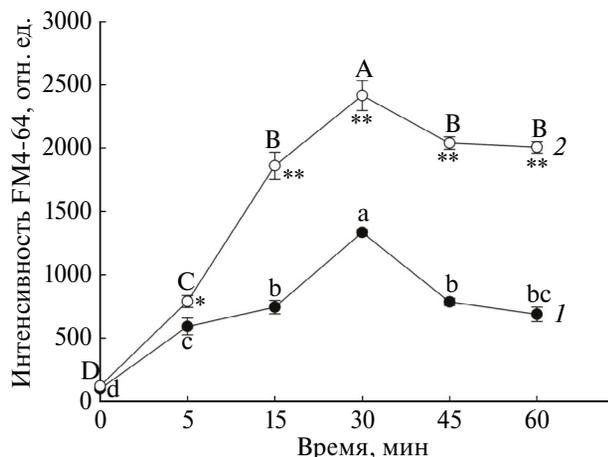


Рис. 1. Динамика конститутивного поглощения эндоцитозного маркера FM4-64 клетками корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana*. FM4-64 – 2 мкМ, 1 – дикий тип, 2 – нокаут-мутант *AtFlot1ko* (SALK_205125C). Значения сравнивали независимо для каждой временной точки (* – $P < 0.05$, ** – $P < 0.001$) и в каждом варианте на протяжении всего времени эксперимента (разными латинскими буквами обозначены статистически достоверные значения при $P < 0.05$).

дуцированную иммунную реакцию клеток растений ДТ и *Atflot1ko*. Известно, что флотилины входят в состав нанодоменов ПМ и в условиях засоления участвуют в КЗЭ [8]. Ранее нами было показано, что внесение в среду инкубации проростков ДТ и нокаут-мутанта 100 мМ NaCl не оказало влияния на интенсивность флуоресценции FM4-64 по сравнению с условиями отсутствия NaCl в среде [10]. В отличие от абиотического стресса, действие биотических факторов среды значительно увеличивало интенсивность флуоресценции FM4-64. Обработка проростков исследуемых линий растений *flg22* в течение 1 ч приводила к увеличению интенсивности поглощения FM4-64 почти в 2.5 раза в клетках корней ДТ и в 1.5 раза у нокаут-мутанта (рис. 2б, д; 3), тем самым демонстрируя активацию эндоцитоза в клетках корней.

Действие 10 мМ НУК, ингибитора КЗЭ на проростки, обработанные пептидом *flg22*, не оказало ингибирующего действия на эндоцитоз в клетках корней дикого типа, лишь отмечалось небольшое, статистически недостоверное снижение флуоресценции FM4-64. При этом в клет-

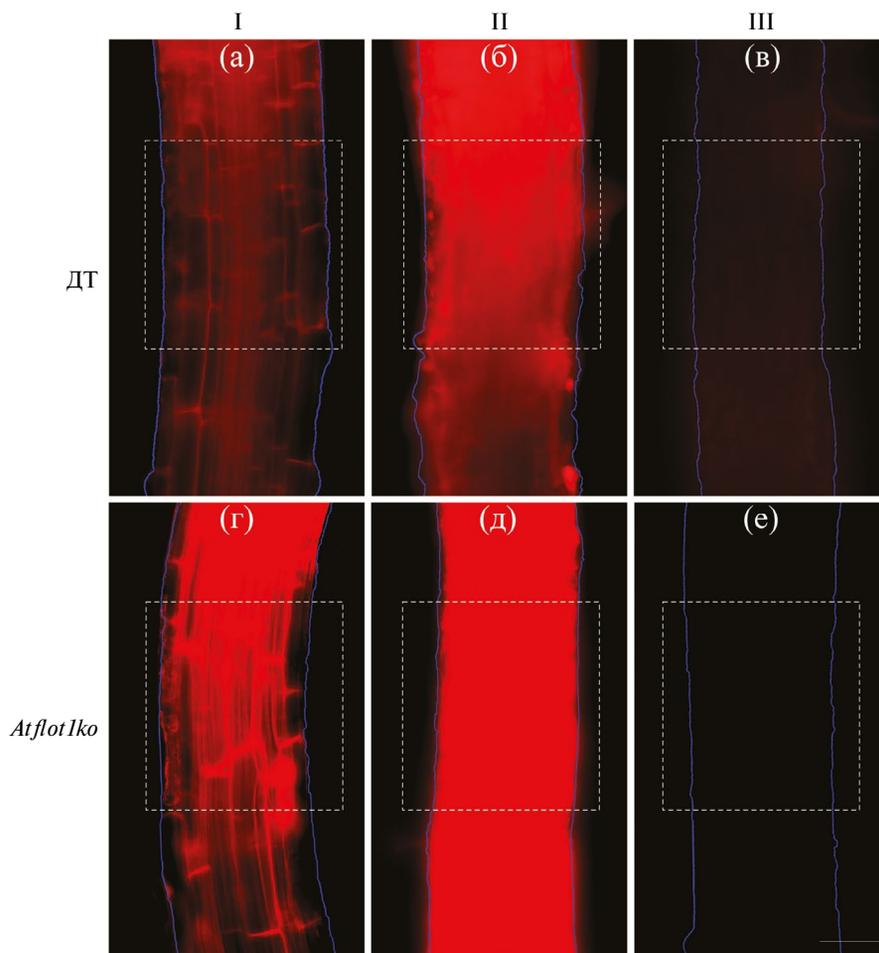


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции FM4-64 в клетках корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana* дикого типа (ДТ) (а, б, в) и нокаут-мутанта (*AtFlot1ko*) (г, д, е). I – контроль (а, г), II – 10 мкМ *flg22* (б, д), III – 10 мкМ *flg22* + 100 мкМ НУК + 10 мМ МВЦД (в, е). Пунктирной рамкой отмечена область корня, используемая для морфометрического расчета интенсивности сигнала FM. Масштаб – 40 мкм.

ках корней *Atflotlko* наблюдалось снижение сигнала флуоресценции в 2 раза (рис. 3). Внесение в среду инкубации 100 мкМ МВЦД, агента, вымывающего стерины из ПМ, приводило к резкому снижению сигнала флуоресценции зонда в 6 и 8 раз соответственно в клетках корней ДТ и нокаут-мутанта, предварительно обработанных флагеллином, по сравнению с контролем (обработка flg22) (рис. 3). При одновременной обработке корней исследуемых линий растений НУК и МВЦД наблюдалось снижение сигнала FM4-64 в клетках корней нокаут-мутанта в 2 раза по сравнению с ДТ (рис. 2в, е; 3). При этом ингибирование эндоцитоза у ДТ и нокаут-мутанта сохранялось.

Изучение ультраструктуры клеток. Сравнение ультраструктуры клеток корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana* ДТ и его нокаут-мутанта, выращенных в контрольных условиях, было показано нами ранее. Клетка имела типичное для растительной клетки строение [30]. Изучение структуры клеток корней исследуемых растений в условиях биотического стресса (действие бактериального пептида – flg22) показало, что реакция иммунного ответа растений отличается от реакции клеток на абиотический стресс (рис. 4а–в). В клетках корней ДТ, обработанных пептидом, ПМ формировала инвагинации, часть которых образовывала парамуральные тела (ПМТ), заполненные мелкими везикулами и мембранным материалом (рис. 4б, в), что, в свою очередь, указывало на активацию процесса эндоцитоза. В ПП экзосомы (Экз) встречались крайне редко (рис. 4в),

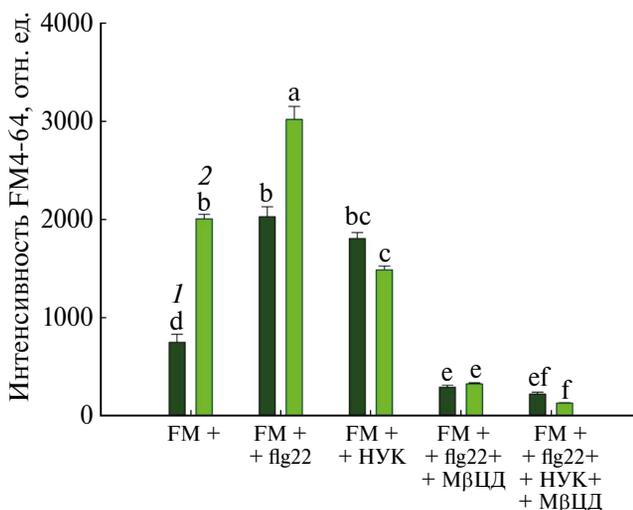


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции FM4-64 клетках корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana*. 1 – дикий тип, 2 – нокаут-мутант *AtFlotlko* (SALK_205125C). Проростки были предобработаны 10 мкМ flg22 в течение 1 ч. FM4-64 – 2 мкМ, НУК – 100 мкМ, МВЦД – 10 мМ. Разными латинскими буквами обозначены статистически достоверные значения при $P < 0.05$.

поздние эндосомы/мультивезикулярные тела (ПЭ/МВТ), встречающиеся в цитоплазме, имели небольшие размеры (рис. 4а, б – вставка, в – вставка). ЭР преимущественно гранулярного типа был плохо развит и представлен короткими трубочками (рис. 4а). КГ в клетках встречались крайне редко в виде плотно упакованных цистерн, на транс-стороне которых формировались единичные ранние эндосомы (РЭ), что говорило о неактивном состоянии данных структур. В цитоплазме свободно плавающих РЭ не наблюдалось, общая везикуляция и вакуолизация компартмента была снижена.

Предобработка проростков ДТ flg22 и одновременное внесение в среду инкубации НУК и МВЦД привели к ингибированию эндоцитоза в клетках корней ДТ (рис. 4г–е). В ПП наблюдалось отсутствие экзосом, ПМ плотно прилегла к клеточной стенке (КС) и не образовывала инвагинации и ПМТ. В цитоплазме встречались ПЭ/МВТ крупных размеров (рис. 4е – вставка). КГ был хорошо развит, на его транс-стороне активно формировались РЭ. Ингибирование эндоцитоза и формирование многочисленного количества ранних эндосом, свободно плавающих в цитоплазме, приводило к ее сильной везикуляции в данных условиях. ЭР был хорошо развит и представлен длинными трубчатыми тяжами (рис. 4г–е). На концах таких трубочек формировались вздутия, которые затем отшнуровывались и превращались также в эндосомы (рис. 4г, д). Мелкие везикулы, наблюдаемые в цитоплазме, чаще всего сливались с тонопластом, придавая мембране извилистую форму (рис. 4г). В данных условиях обработки корней ДТ мы наблюдали активацию секреторного пути и направление транспорта веществ в секреторных пузырьках к центральной вакуоли.

Ультраструктура клеток корней проростков нокаут-мутантов, обработанных flg22, имела иную картину. Между ПП и ПМ скапливались экзосомы разных размеров и формы (рис. 4ж, з – вставка, и – вставка), чередуясь с участками ПМ, плотно прилегающей к КС. ЭР гранулярного типа был хорошо развит и имел вид длинных трубчатых тяжей (рис. 4ж–и). КГ встречался также редко, как и у ДТ в аналогичных условиях, однако на транс-стороне данных структур РЭ формировались чаще и имели более крупные размеры (100–200 нм), чем у ДТ (50–120 нм). (рис. 4ж). Поздние эндосомы мелких размеров (рис. 4ж – вставка), изредка сливались с тонопластом и выбрасывали свое содержимое (везикулы) в вакуоль, такое слияние мембран также приводило к усилению извилистости тонопласта (рис. 4ж – вставка), как и у ДТ. Таким образом, при данных условиях мы наблюдали активацию канонического пути экзоцитоза (секреция веществ к поверхности клеток).

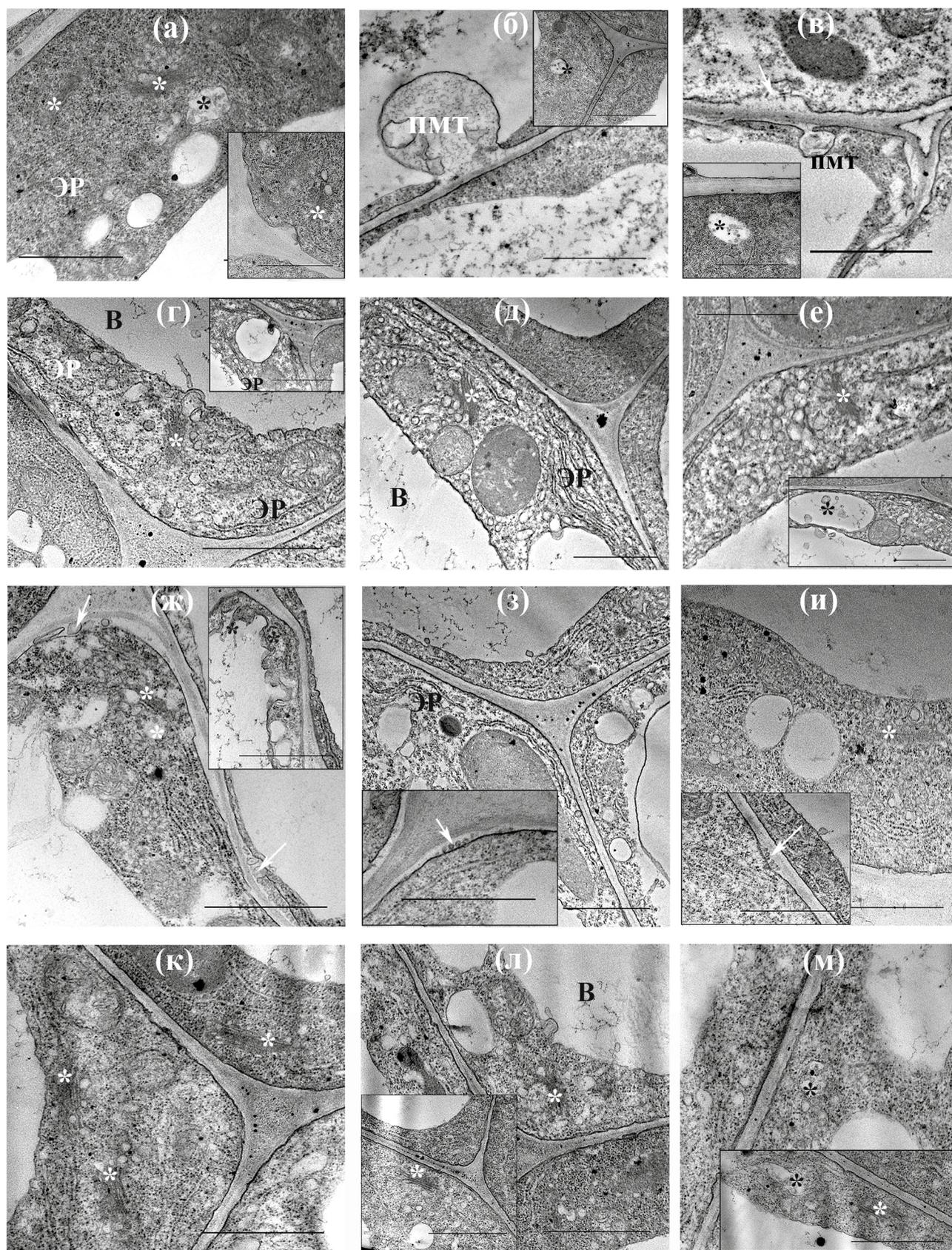


Рис. 4. Ультраструктура клеток корней 5-дневных проростков *A. thaliana* дикого типа и его нокаут-мутанта (*AtFlot1ko*): а-в – дикий тип, 10 мкМ flg22; г-е – дикий тип, 100 мкМ НУК + 10 мМ МВЦД; ж-и – *AtFlot1ko*, 10 мкМ flg22; к-м – *AtFlot1ko*, 100 мкМ НУК + 10 мМ МВЦД. ЭР – эндоплазматический ретикулум; ПМТ – парамуральное тело; В – вакуоль; белая звездочка – транс-Гольджи сеть/ранние эндосомы; черная звездочка – поздняя эндосома/мультивезикулярное тело; белая стрелка – экзосомы. Масштаб – 1 мкм.

Предобработка проростков бактериальным элиситором и одновременное действие на них НУК и МВЦД привели к тому, что в клетках корней нокаут-мутанта в ПП экзосомы не обнаруживались и ПМ плотно прилегала к КС. Визуально увеличилось количество КГ и число диктиосом в них. На транс-стороне КГ и на концах диктиосом образовывалось множество мелких секреторных везикул, которые сливались с тонопластом (рис. 4к, л). В цитоплазме встречались мелкие ПЭ/МВТ (рис. 4м). Однако, количество и размеры образующихся эндосом в клетках корней нокаут-мутанта были значительно меньше, чем у растений ДТ, что подтверждает наше предположение об участии флотилинов в процессах образования РЭ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения роли флотилинов в иммунитете растений мы проанализировали flg22-индуцированный иммунный ответ в клетках корней проростков растений *A. thaliana* ДТ и его нокаут-мутанта *Atflot1ko*. Наши исследования показали, что при обработке растений нокаут-мутанта бактериальным flg22 сигнал флуоресценции маркера FM4-64 в клетках увеличивался по сравнению с ДТ, подтверждая данные о поглощении зонда клетками через КЗЭ [31] (рис. 2б, д; 3). Тем самым мы подтвердили полученные нами ранее данные о наличии у нокаут-мутанта только клатрин-зависимого пути эндоцитоза. В предыдущей нашей работе было показано отсутствие реакции клеток как у растений ДТ, так и у нокаут-мутанта на действие абиотического стресса (100 мМ NaCl) [10]. Полученные результаты говорят о запуске иммунного ответа в клетках корней исследуемых растений при биотическом стрессе.

Обработка проростков ДТ ингибитором КЗЭ (НУК) не оказала влияния на интернализацию окрашенного FM4-64 мембранного материала клетками корней в условиях биотического стресса, тогда как у растений нокаут-мутанта наблюдалось количественное снижение сигнала зонда. В предыдущих исследованиях мы показали, что у исследуемого мутанта отсутствует клатрин-независимый путь эндоцитоза. Так, обработка мутантных проростков ауксином (НУК) в условиях абиотического стресса на 15% ингибировала КЗЭ [10], тогда как интенсивность флуоресценции FM4-64 в условиях биотического стресса при внесении НУК в среду инкубации снижалась на 50%. Таким образом, в условиях обработки растений пептидом ингибирование КЗЭ в клетках корней нокаут-мутантов сильнее выражено, чем в условиях засоления, в связи с этим мы можем утверждать, что такой путь эндоцитоза для патогенов явля-

ется доминирующим и, вероятно, в данном случае речь идет о рецепторопосредованном пути эндоцитоза, зависящем от клатрина. При этом полное его ингибирование могло бы привести к нарушению транспортных функций в целом. Снижение сигнала FM4-64 у нокаут-мутанта в 2 раза, возможно, объясняется частичной блокировкой КЗ-пути эндоцитоза, тогда как отсутствие реакции на действие ингибитора у ДТ говорит об активации КНЗ-пути, в котором участвуют флотилины. Было показано, что в условиях абиотического стресса (100 мМ NaCl) обработка проростков растений нокаут-мутанта *A. thaliana* НУК так же приводила к снижению флуоресценции до 35%, тогда как интенсивность сигнала FM4-64 в этих условиях в клетках ДТ, так же, как и при действии flg22, не изменялась [10]. Таким образом можно предположить, что в условиях стресса (как абиотического, так и биотического) в клетках растений нокаут-мутанта транспорт веществ с поверхности клетки преимущественно осуществляется по КЗ-пути эндоцитоза, а у дикого типа стресс активирует КНЗЭ с участием флотилинов.

Обогащенные стеринами рафты, содержащие специфические домены, могут играть важную роль в передаче сигналов, индуцированных молекулярными паттернами патогенов, тем самым влияя на эндоцитоз белков ПМ у растений [32, 33]. Yu с соавт. [34] показали, что обработка flg22 может усиливать эндоцитоз GFP-Flot1 с поверхности клеток, а Cui с соавт. [35] обнаружили, что FLS2-GFP локализуется с эндосомами AtFlot1-mCherry (маркер богатых стеринами доменов), что подтверждает полученные нами результаты. В микродоменах ПМ содержатся рецепторы FLS2, которые, связываясь с flg22-пептидом, запускают рецептор-опосредованный (клатрин-зависимый) эндоцитоз с образованием FLS2-эндосом [36]. В наших исследованиях обработка проростков МВЦД агентом, вымывающим стерину из микродоменов ПМ, показала значительное ингибирование эндоцитоза (КЗЭ и КНЗЭ) как в клетках корней ДТ, так и у нокаут-мутанта (рис. 2). Полученные результаты подтверждают, что мембранные стерину, входящие в состав микродоменов ПМ, играют важную роль в запуске рецептор-опосредованного эндоцитоза, указывая на их вовлечение в интернализацию FLS2-эндосом, индуцированных flg22-пептидом. Одновременное внесение в среду инкубации НУК и МВЦД привело к статистически достоверному снижению флуоресценции зонда (в 2 раза) в клетках предобработанных flg22 проростков *Atflot1ko* (рис. 2, 3). Таким образом, мы можем утверждать, что одновременное действие трех факторов (flg22, НУК и МВЦД) в условиях биотического стресса максимально блокирует процессы эндоцитоза у нокаут-мутан-

та. Действие МВЦД на клетки корней нокаут-мутанта, по-видимому, приводит к натяжению ПМ и полному блокированию единственно-возможного пути эндоцитоза, тем самым подтверждая важную роль стерингов в составе микродоменов ПМ в процессах КЗЭ. При этом у ДТ частично сохраняется сигнал флуоресценции, что указывает на процесс КНЗЭ в клетках и участие в нем Flot1. Однако в условиях абиотического стресса аналогичное действие НУК и МВЦД на растения *A. thaliana* приводило к обратной картине – сохранению сигнала флуоресценции в клетках нокаут-мутанта [10]. Изучение данных процессов показало, что в разных условиях стресса (абиотического и биотического) в клетках корней растений ДТ и нокаут-мутанта активируется тот или иной эндоцитозный (КЗ или КНЗ) путь.

Обработка проростков бактериальным элиситором в течение 1 ч привела к следующим изменениям ультраструктуры клеток. С помощью ТЭМ в клетках корней ДТ наблюдалось активирование эндоцитоза: на поверхности клеток часто образовывались инвагинации ПМ и ПМТ (рис. 4б, в). Эти структуры, скорее всего, необходимы для переноса молекул патогена с поверхности клеток в вакуоль, где происходит их деградация, следовательно цитоплазма и ее содержимое будут защищены от токсического действия flg22. В аналогичных условиях у проростков нокаут-мутанта наблюдалось образование многочисленного количества экзосом в ПП (рис. 4ж, з – вставка, и – вставка). МВТ максимально близко располагались к ПМ. Такое расположение структур, скорее всего, приведет к слиянию двух мембран и высвобождению содержимого МВТ в ПП. Все эти процессы указывают на активацию процесса экзоцитоза в клетках (рис. 4ж, ж – вставка). Однако на рисунке 2 видно, что сигнал флуоресценции FM4-64 в клетках нокаут-мутанта увеличивается на 25%, что говорит об эндоцитозе. Образование мелких везикул размерами до 50 нм с внутренней стороны ПМ подтверждает наше предположение о двунаправленности транспортных путей в клетках корней нокаут-мутанта (рис. 4з). ЭР был хорошо развит, КГ встречался реже, чем у ДТ. Большое количество экзосом в ПП и хорошо развитый ЭР в клетках корней нокаут-мутанта говорит об активации процесса синтеза защитных белков, направленных на борьбу с бактериальными патогенами, а их транспорт к ПМ осуществляется в секреторных пузырьках. По каноническому секреторному пути должным образом свернутые белки транспортируются из ЭР к пузырькам Гольджи и впоследствии к КГ/РЭ, которые затем сливаются с ПМ для доставки растворимого груза во внеклеточное пространство или мембранного груза к ПМ. У растений КГ/РЭ служит ключевой со-

ртировочной станцией на пересечении секреторных и эндоцитозных путей. Такой процесс вновь синтезированных белков к поверхности клеток сокращает время между синтезом и секрецией иммунных молекул, демонстрируя запуск защитных механизмов в иммунном ответе клеток [37].

Одновременная обработка НУК и МВЦД растений ДТ, предобработанных бактериальным элиситором, стимулировала образование ЭР, что также является необходимым для иммунного ответа растений. Известно, что обработка растений flg22 приводит к слиянию ПЭ/МВТ с ПМ и высвобождению в ПП экзосом (экзоцитоз), содержащих каллозообразующие ферменты и играющих важную роль в защите растений [38]. Заново синтезированные ферменты в хорошо развитом ретикулуме транспортируются в РЭ к ПМ. В наших исследованиях в клетках корней ДТ утолщения КС не наблюдалось, а обработка бактериальным пептидом flg22, наоборот, привела к ингибированию экзоцитоза и активации эндоцитоза. Аналогичные условия обработки корней проростков нокаут-мутанта демонстрировали активную работу КГ, образование РЭ и их транспорт к ПМ (рис. 4ж–и). Полученные данные указывают на то, что у исследуемых растений в условиях биотического стресса существуют разные пути и способы деградации патогена с поверхности клеток, и ответная реакция растений на стресс зависит от многих факторов, в том числе и от уровня развития в клетках ЭР. В ответ на бактериальную атаку растения способны формировать связи между ПМ и вакуолью, чтобы высвободить в ПП антибактериальные молекулы. Данный процесс мы наблюдали у нокаут-мутанта, тогда как у ДТ патоген с поверхности клетки в вакуоль выводится с помощью ПМТ, минуя цитоплазму, для дальнейшего его разрушения. Возможно, в этом случае локализованные в ПМ FLS2-рецепторы распознавания flg22 [18, 21] конститутивно циркулируют в клетке в виде FLS2-эндосом [24]. Было показано, что после активации FLS2 связанный с флагеллином участок мембраны подвергается эндоцитозу и последующей деградации в вакуоли по убиквитин-протеасомному пути [16, 24, 25]. Совместная локализация эндоцитозированного FLS2, связанного с flg22 и с Aga6/7 малыми ГТФазами, которые маркируют ПЭ/МВТ, показала, что активированные FLS2-эндосомы разрушаются в вакуоли [24, 39], что также подтверждает полученные нами данные. Об активном транспорте мембранных компонентов с помощью эндо- и экзоцитоза также свидетельствуют следующие данные: во-первых, анализ временных рядов и изображений, полученных с помощью VA-TIRFM, оценивающий флуоресцентный сигнал FLS2-GFP, выявил, что

рецепторы FLS2 очень подвижны и гетерогенно распределены на ПМ [35]; во-вторых, Mbengue с соавтор. [40] показали опосредованный клатрином flg22-индуцированный эндоцитоз FLS2 эндосом из ПМ, что, в свою очередь, переключает транспорт FLS2 в поздний эндосомальный путь, связанный с деградацией рецептора. Лиганд-индуцированный эндоцитоз является консервативным механизмом. Запуск иммунной системы растений приводит к активации всех рецепторов на поверхности мембран, которые далее локализируются в ранних эндосомах. Это подчеркивает общий путь транспортировки активных рецепторов растений, подтверждая гипотезу, а также и наши данные том, что эндоцитоз рецепторов нацелен на один и тот же конечный пункт – вакуоль. Такой путь, по-видимому, является общим у различных типов семейств рецепторов и рецепторных киназ для доставки грузов с поверхности клетки в вакуоль. Известно, что патогены секретируют эффекторы, вызывающие перемещение эндосомального FLS2 в место заражения [40], что подтверждает нацеленность патогенов на этот общий эндосомальный путь подавления рецептор-опосредованного иммунитета растений.

Таким образом, были сделаны следующие выводы: 1) действие биотического стресса не оказало влияния на ультраструктуру КГ и процесс образования РЭ в клетках корней исследуемых растений, что крайне важно для правильного функционирования эндосомального пути в клетках растений; 2) бактериальный пептид у нокаут-мутанта активирует процессы защиты клеток от патогенов путем запуска синтеза защитных белков и их транспорта к ПМ и в ПП (секреторный путь). В тоже время, растения ДТ избавляются от патогена с поверхности клетки, запуская flg22-индуцированный эндоцитоз с образованием ПМТ [24, 39], в формировании которых, скорее всего, принимают участие флотилины, которые определяют количество и размерность ПМТ. Учитывая фундаментальную важность секреторных путей для защиты растений от действия стрессовых факторов окружающей среды, необходимо понимать роль различных типов секреторных пузырьков (КГ/РЭ, ПЭ/МВТ и экзосом) в запуске соответствующих иммунных реакций.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 122042700044-6 и № 122042700043-9).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mahalingam R. Consideration of combined stress: a crucial paradigm for improving multiple stress tolerance in plants // Combined Stresses in Plants / Ed. R. Mahalingam. Springer Intern. Publ. Switzerland. 2015. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07899-1_1
2. Jones J.D., Dangl J.L. The plant immune system // Nature. 2006. V. 444. P. 323.
3. Inada N., Ueda T. Membrane trafficking pathways and their roles in plant-microbe interactions // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. P. 672. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu046>
4. Ortiz-Morea F.A., Savatin D.V., Dejonghe W., Kumar R., Luo Y., Adamowski M., Van den Begin J., Dresano K., Pereira de Oliveira G., Zhao X., Lu Q., Madder A., Friml J., Scherer de Moura D., Russinova E. Danger-associated peptide signaling in Arabidopsis requires clathrin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 11028. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605588113>
5. Geldner N., Robatzek S. Plant receptors go endosomal: A moving view on signal transduction // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1565. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120287>
6. Freidit Frey N., Robatzek S. Trafficking vesicles: pro or contra pathogens? // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 437. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.002>
7. Sorkin A., von Zastrow M. Endocytosis and signalling: Intertwining molecular networks // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009. V. 10. P. 609. <https://doi.org/10.1038/nrm2748>
8. Li R., Liu P., Wan Y., Chen T., Wang Q., Metzbach U., Baluska F., Samaj J., Fang X., Lucas W.J., Lin J. A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 2105. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095695>
9. Khalilova L.A., Sergienko O.V., Orlova Y.V., Myasoedov N.A., Karpichev I.V., Balnokin Y.V. Arabidopsis thaliana mutant with t-DNA insertion in the Flot1 (At5g25250) gene promotor possesses increased resistance to NaCl // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 275. <https://doi.org/10.1134/S1021443720020077>
10. Khalilova L.A., Voronkov A.S. The membrane nanodomain Flot1 protein participates in formation of the early endosomes in the root cells of Arabidopsis thaliana // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70. P. 74. <https://doi.org/10.1134/S1021443723600307>
11. Boller T., Felix G. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors // Ann. Rev. Plant Biol. 2009. V. 60. P. 379. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
12. Böhm H., Albert I., Fan L., Reinhard A., Nürnberger T. Immune receptor complexes at the plant cell surface // Curr. Opin. Plant Biol. 2014. V. 20. P. 47. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.007>

13. *Dodds P.N., Rathjen J.P.* Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 539.
<https://doi.org/10.1038/nrg2812>
14. *Monaghan J., Zipfel C.* Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. V. 15. P. 349.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>
15. *Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., Felix G.* The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 3496.
<https://doi.org/10.1105/tpc.104.026765>
16. *Robatzek S., Chinchilla D., Boller T.* Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis* // *Gene Dev.* 2006. V. 20. P. 537.
<https://doi.org/10.1101/gad.366506>
17. *Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard E.M.H., Albrechtsen A.S., James E.K., Thirup S., Stougaard J.* LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 3923.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601826>
18. *Gómez-Gómez L., Boller T.* FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis* // *Mol. Cell.* 2000. V. 5. P. 1003.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80265-8)
19. *Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J.D., Felix G., Boller T.* A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence // *Nature.* 2007. V. 448. P. 497.
<https://doi.org/10.1038/nature05999>
20. *Sun Y., Li L., Macho A.P., Han Z., Hu Z., Zipfel C., Zhou J.M., Chai J.* Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex // *Sci.* 2013. V. 342. P. 624.
<https://doi.org/10.1126/science.1243825>
21. *Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D., Felix G., Boller T.* Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception // *Nature.* 2004. V. 428. P. 764.
<https://doi.org/10.1038/nature02485>
22. *Salomon S., Robatzek S.* Induced endocytosis of the receptor kinase FLS2 // *Plant Signal. Behav.* 2006. V. 1. P. 293.
<https://doi.org/10.4161/psb.1.6.3594>
23. *Russinova E., Borst J.W., Kwaaitaal M., Caño-Delgado A., Yin Y., Chory J., de Vries S.C.* Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1) // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 3216.
<https://doi.org/10.1105/tpc.104.025387>
24. *Beck M., Zhou J., Faulkner C., MacLean D., Robatzek S.* Spatio-temporal cellular dynamics of the *Arabidopsis* flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting // *Plant Cell.* 2012. V. 24. P. 4205.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.100263>
25. *Lu D., Lin W., Gao X., Wu S., Cheng C., Avila J., Heese A., Devarenne T.P., He P., Shan L.* Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity // *Sci.* 2011. V. 332. P. 1439.
<https://doi.org/10.1126/science.1204903>
26. *Smith J.M., Salamango D.J., Leslie M.E., Collins C.A., Heese A.* Sensitivity to Flg22 is modulated by ligand-induced degradation and de novo synthesis of the endogenous flagellin-receptor FLAGELLIN SENSING2 // *Plant Physiol.* 2014. V. 164. P. 440.
<https://doi.org/10.1104/crp.113.229179>
27. *Scheuring D., Künzl F., Viotti C., Yan M.S., Jiang L., Schellmann S., Robinson D.G., Pimpl P.* Ubiquitin initiates sorting of Golgi and plasma membrane proteins into the vacuolar degradation pathway // *BMC Plant Biol.* 2012. V. 12. P. 164.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-164>
28. *Ben Khaled S., Postma J., Robatzek S.* A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity // *Ann. Rev. Phytopathol.* 2015. V. 53. P. 379.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120347>
29. *Mishina T.E., Zeier J.* Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2007. V. 50. P. 500.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x>
30. *Khalilova L.A., Lobreva O.V., Nedelyaeva O.I., Karpichev I.V., Balnokin Y.V.* Involvement of the membrane nanodomain protein, AtFlot1, in vesicular transport of plasma membrane H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* under salt stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 1251.
<http://doi.org/10.3390/ijms24021251>
31. *Narasimhan M., Gallei M., Tan S., Johnson A., Verstraeten I., Li L., Rodriguez L., Han H., Himschoot E., Wang R., Vanneste S., Sánchez-Simarro J., Aniento F., Adamowski M., Friml J.* Systematic analysis of specific and nonspecific auxin effects on endocytosis and trafficking // *Plant Physiol.* 2021. V. 186. P. 1122.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab134>
32. *Keinath N.F., Kierszniowska S., Lorek J., Bourdais G., Kessler S.A., Shimosato-Asano H., Grossniklaus U., Schulze W.X., Robatzek S., Panstruga R.* PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 39140.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160531>
33. *Malinsky J., Opekarova M., Grossmann G., Tanner W.* Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 501.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120103>
34. *Yu M., Liu H., Dong Z., Xiao J., Su B., Fan L., Komis G., Samaj J., Lin J., Li R.* The dynamics and endocytosis of Flot1 protein in response to flg22 in *Arabidopsis* // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 215. P. 73.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.05.010>

35. Cui Y., Li X., Yu M., Li R., Fan L., Zhu Y., Lin J. Sterols regulate endocytic pathways during flg22-induced defense responses in *Arabidopsis* // *Development*. 2018. V. 145. dev165688. <https://doi.org/10.1242/dev.165688>
36. Yeh Y.H., Chang Y.H., Huang P.Y., Huang J.B., Zimmerli L. Enhanced *Arabidopsis* pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 322. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00322>
37. Koh S., Andre A., Edwards H., Ehrhardt D., Somerville S. *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections // *Plant J.* 2005. V. 44. P. 516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02545.x>
38. Assaad F.F., Qiu J.L., Youngs H., Ehrhardt D., Zimmerli L., Kalde M., Wanner G., Peck S.C., Edwards H., Ramonell K., Somerville C.R., Thordal-Christensen H. The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. P. 5118. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0140>
39. Choi S.W., Tamaki T., Ebine K., Uemura T., Ueda T., Nakano A. RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the FLAGELLIN SENSING2 receptor // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 1174. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108803>
40. Mbengue M., Bourdais G., Gervasi F., Beck M., Zhou J., Spallek T., Bartels S., Boller T., Ueda T., Kuhn H., Robatzek S. Clathrin-dependent endocytosis is required for immunity mediated by pattern recognition receptor kinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 11034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606004113>

УДК 581.1:576.5:57.085.23

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ КЛОНОВ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ *Picea abies* (L.) Н. Karst. ИЗ СРЕДНЕТАЕЖНОЙ ПОДЗОНЫ КАРЕЛИИ К СОМАТИЧЕСКОМУ ЭМБРИОГЕНЕЗУ

© 2024 г. Р. В. Игнатенко^{а, *}, О. В. Чирва^а, М. А. Ершова^а,
Н. А. Галибина^а, И. А. Теслюк^а

^аИнститут леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,

Петрозаводск, Россия

*e-mail: ocean-9@mail.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 01.01.2024 г.

Принята к публикации 03.01.2024 г.

Представлены результаты исследования соматического эмбриогенеза у ели европейской (*Picea abies* (L.) Н. Karst.), произрастающей на территории подзоны средней тайги в Республике Карелия (Россия). Незрелые зиготические зародыши отбирали с 10 клонов плюсовых деревьев на Петрозаводской лесосеменной плантации и дерева в г. Петрозаводске при сумме эффективных температур от 728 до 1257 градусо-дней (при базовой температуре 5°). Установлено, что в качестве субстрата для индукции соматического эмбриогенеза и пролиферации клеточных линий необходимо использовать питательную среду LM, а в качестве эксплантов — зародыши на стадиях развития от глобулярной до семядольной. Спустя 14 месяцев культивирования из 26 клеточных линий, полученных от эксплантов с Петрозаводской лесосеменной плантации, сохранилось 12 шт. (46%), а из дерева в г. Петрозаводске — 2 клеточные линии из 23 (9%). В результате исследования выявлены материнские генотипы клонов плюсовых деревьев ели европейской, способные к образованию эмбрионально-сuspензорной массы, длительной пролиферации и формированию растений-регенерантов.

Ключевые слова: *Picea abies*, ель европейская, зиготические зародыши, клоны плюсовых деревьев, микроклональное размножение хвойных, эмбриогенные культуры

DOI: 10.31857/S0015330324010039, EDN: NWHIYW

ВВЕДЕНИЕ

Древесина является универсальным, экологичным и возобновляемым материалом, который используется во многих отраслях промышленности [1]. Однако в результате антропогенного воздействия (лесозаготовка, сельскохозяйственные мероприятия и др.) площади лесных фитоценозов стремительно сокращаются [2–4]. В связи с этим необходимы программы по эффективному лесовосстановлению. Использование микроклонального размножения с применением селекционно-генетических методов отбора растительного материала может способствовать ускоренному получению качественного семенного материала экономически ценных древесных видов.

Ель европейская (*Picea abies* (L.) Н. Karst.) является одним из важнейших лесообразующих видов на территории Европы. Для восстановления фитоценозов без вреда для естественных лесов создаются плантации с использованием высокопродуктивных генотипов [4]. Однако семенная продуктивность *P. abies* варьирует от года к году из-за нерегулярного цветения и вредителей [5]. В связи с чем получение большого объема посадочного материала из ограниченного количества семян представляется крайне перспективным, что для хвойных растений наиболее эффективно достигается с помощью соматического эмбриогенеза (СЭ).

Впервые СЭ у голосеменных был описан в 1985 г. на примере незрелых зародышей *P. abies* [6, 7] и мегагаметофитов *Larix deciduas* Mill [8]. К сожалению, несмотря на то, что метод СЭ уже разработан, его широкое применение для *P. abies* сильно ограничено в связи с тиражи-

Сокращения: Петрозаводская ЛСП — Петрозаводская лесосеменная плантация; СЭ — соматический эмбриогенез; ЭСМ — эмбрионально-сuspензорная масса.

ванием только определенных генотипов, а также высокими затратами на ручной труд [4, 9, 10]. Между тем в литературе представлены данные по инициации СЭ у *P. abies*, а также получению растений-регенерантов и созданию на их основе плантаций [5, 11]. Помимо этого, имеются сведения об инициации СЭ для ряда других видов рода *Picea*: *P. sitchensis* (Bong.) Carr. [12, 13], *P. omorica* Purk., *P. pungens* “Glauca” Beissn., *P. breweriana* S. Watson [14], *P. mariana* (Mill.) [15], *P. morrisonicola* Hay. [16], *P. koraiensis* Nakai [17], *P. ajanensis* Fisch. ex Carr. [18], *P. obovata* Ledeb. [19] и др.

В России на сегодняшний день информация об успешной инициации СЭ и получении растений-регенерантов у *P. abies* в изученной нами литературе отсутствует. Более того, эффективность СЭ сильно варьирует на разных этапах и для различных генотипов растений, поэтому модификация протоколов на каждой стадии до сих пор остается актуальной задачей [4].

Цель исследования – изучение процесса соматического эмбриогенеза у эксплантов ели европейской, собранных с разных деревьев-доноров в среднетаежной подзоне Карелии и при разных условиях культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор незрелых шишек производили с 10 клонов плюсовых деревьев ели европейской (*Picea abies* (L.) Н. Karst.), произрастающих на двух участках Петрозаводской лесосеменной плантации (ЛСП) I порядка (Прионежский район, Республика Карелия). Плантация закладывалась в 1977-х годах (участок 1, деревья № 1–5) и 1994 (участок 2, деревья № 6–10). Характеристика деревьев приведена в табл. 1. Сбор шишек на Петрозаводской ЛСП проводили 27 июля, 25 августа и 19 сентября, что соответствовало сумме эффективных температур 728, 1126 и 1257 градусо-дней (при базовой температуре 5°C) соответственно. Также однократно – 4 августа (сумма эффективных температур – 822 градусо-дня) шишки были отобраны с дерева *P. abies* (возраст 15 лет), которое произрастало на территории Петрозаводского городского округа (г. Петрозаводск). В каждую дату отбора при помощи стереомикроскопа (Leica, Германия) определяли стадию развития зиготического зародыша.

Перед введением зародышей в культуру шишки хранили в холодильнике при температуре 4°C в течение 3–4 недель. Обработка растительного материала включала несколько этапов. Из шишек извлекали семена, которые в нестерильных условиях помещали в 70% этиловый спирт на одну минуту. Далее, в стерильных условиях семена помещали в 10% раствор перекиси водорода на 10 мин, после чего промывали в обильном количестве стерильной воды в течение 10 мин.

Таблица 1. Морфологическая характеристика деревьев ели, произрастающих на Петрозаводской лесосеменной плантации

№ дерева	Высота, м	Диаметр (0.3 м), см	Диаметр (1.3 м), см	Возраст дерева, лет
1	18	47	43	42
2	16	44	43	27
3	12	36	30	30
4	14	33	29	34
5	14	43	37	31
6	10	25	23	21
7	10	26	22	22
8	10	25	28	26
9	10	20	24	24
10	9	19	22	20

Семена очищали от покровных чешуй, мегаспорофиты осторожно вскрывали и зиготические зародыши помещали на среду инициации. В каждую банку, как правило, помещали 4 зиготических зародыша. Банки выдерживали в темноте при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Для инициации соматического эмбриогенеза в соответствии с данными литературы было выбрано две среды: DCR [20] и LM с модификациями [9, 21]. В качестве регуляторов роста растений использовали 2,4-Д (9.0 мкмоль) и БАП (4.5 мкмоль), содержание сахарозы в обеих средах составляло 10 г/л, агара – 6 г/л.

После того, как размеры культуры клеток достигали примерно 5–10 мм, из культуры удаляли зиготический зародыш, и ткань пересаживали на питательную среду для пролиферации (LM или DCR соответственно) для получения эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) и создания клеточной линии. При успешной пролиферации клеточных линий субкультивирование проводили каждые 2 недели.

Для вызревания соматических зародышей часть ЭСМ помещали на питательную среду созревания (maturation LM) схожего состава, но содержащую вместо 2,4-Д и БАП – 30 мкмоль АБК, 60 г/л сахарозы и 9 г/л агара [9]. Сформированные семядольные соматические зародыши переносили на среду прорастания (germination LM) на 10–21 сутки, в зависимости от клеточной линии. Среда прорастания отличалась меньшим содержанием сахарозы (20 г/л), отсутствием NH_4NO_3 и фитогормонов. Культивирование на средах созревания и прорастания осуществляли на свету при 16-часовом фотопериоде.

Цитологический анализ полученных культур клеток *P. abies* проводился с применением метода давленных препаратов. Перед началом анализа каллус 1–2 мин выдерживали в красителе (0.2%

водный раствор сафранина с добавлением одной капли насыщенного спиртового раствора метиленового синего), затем на предметное стекло переносили исследуемый образец культуры клеток и добавляли одну каплю глицерина [22]. Препараты просматривали под световым микроскопом (Carl Zeiss Primo Star, Германия) при 4-х и 10-кратном увеличении. Для микрофото-съемки использовали цифровую камеру-окуляр ADFstd 10 (ADF, КНР).

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка развития зиготических зародышей показала, что на 27 июля 2022 г. большая часть зародышей находилась на глобулярной стадии развития (рис. 1а). В это время зародыш проходил этап раннего эмбриогенеза, на котором за счет деления клеток суспензора эмбрион продвигался к холозальному концу мегагаметофита, увеличивался в размерах и развивался. Следующий этап – поздний эмбриогенез, в результате которого 25 августа были зарегистрированы семядольные зародыши (рис. 1б). Завершается эмбриогенез формированием зрелого зиготическо-

го зародыша биполярной структуры, который несет на одном конце гипокотиля зародышевый корешок, на другом семядоли (19 сентября). Хранение материала при низких положительных температурах в течение 3–4 недель до введения в культуру *in vitro* способствовало замедлению развития.

В рамках исследования в культуру *in vitro* был введен 291 зиготический зародыш, собранный на Петрозаводской ЛСП с клонов плюсовых деревьев *P. abies* (помещены на питательную среду LM – 263 шт., на среду DCR – 28 шт.), а также 24 зародыша, отобранные с *P. abies* в г. Петрозаводске (помещены на питательную среду LM). Стоит отметить, что 18% (57 шт.) эксплантов из общей выборки, введенные в культуру *in vitro*, подверглись контаминации в первые 14 дней эксперимента и не учитывались при дальнейшем анализе.

Шишки, собранные с Петрозаводской ЛСП, были повреждены огневкой шишковой (*Dioryctria abietella* Schiff.). При вскрытии шишек от клонов плюсовых деревьев № 4, 5 и 8 целых семян обнаружить не удалось, соответственно в культуру *in vitro* экспланты с этих деревьев введены не были.

Образование массы клеток происходило на 7–14 сутки в зависимости от генотипа растения и среды инициации. При этом стадия развития

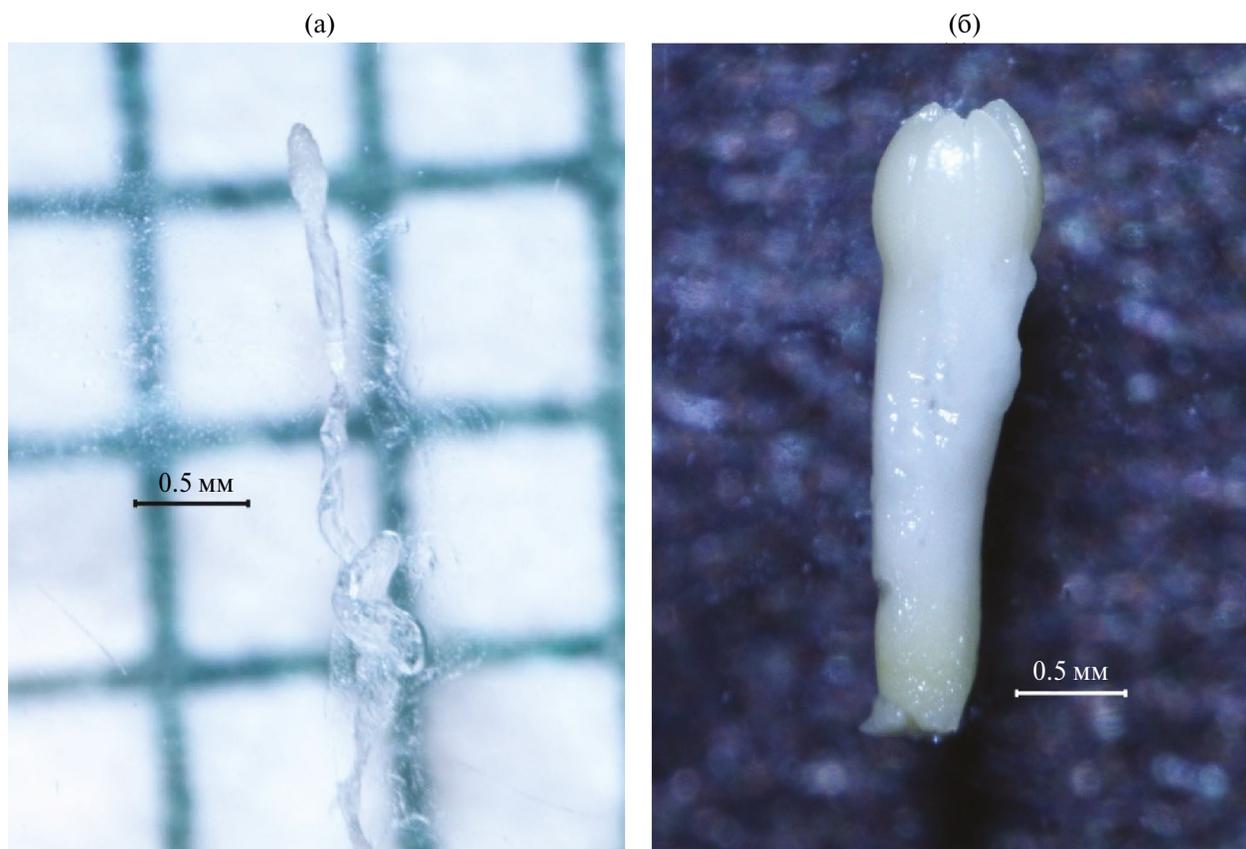


Рис. 1. Внешний вид зиготического зародыша *Picea abies*: а – глобулярный зародыш (27 июля); б – семядольный зародыш (25 августа). Масштаб – 0.5 мм.

зиготических зародышей *P. abies*, отобранных 27 июля и 25 августа, не оказывала существенно-го влияния на данный процесс. Зародыши, собранные 19 сентября, в 50% случаев в культуре *in vitro* развивались в растения.

В результате сравнения данных по инициации культуры клеток на питательных средах LM и DCR из зародышей, полученных из семян деревьев *P. abies*, произрастающих на Петрозаводской ЛСП, было установлено, что инициация культуры в 2.5 раза чаще происходила на питательной среде LM (рис. 2а). В то же время 96% эксплантов *P. abies* из г. Петрозаводска образовывали массу клеток на среде LM. При визуальном осмотре наличие вредителей в шишках с данного растения обнаружено не было.

В результате морфологической оценки было выявлено, что на питательной среде DCR формировался белый и твердый каллус, который через некоторое время начинал темнеть, переставая развиваться. На среде LM формирующаяся масса клеток была прозрачной, слизистой и мягкой (рис. 3а). Именно такие культуры, как показали цитологические исследования, являлись ЭСМ (рис. 4). Формирование ЭСМ начинается в результате удлинения и неравного деления клеток, с образования длинной эмбриональной трубки и эмбриональной инициали [23]. Подобное деление является основным критерием успешности СЭ. Дальнейшее деление эмбриональных инициалей приводит к формированию глобулярной структуры зародыша. Через месяц культивирования из ЭСМ были выделены клеточные линии, которые отличались между собой по пролиферативной активности. Было сформировано 26 клеточных линий для деревьев с Петрозаводской ЛСП, что составляет 35% от общего числа образовавшихся масс клеток. Стоит отметить, что ЭСМ активно формировалась из эксплантов двух генотипов *P. abies*, произрастающих на Петро-

водской ЛСП – № 3 и 7 (рис. 2б). Из эксплантов, деревом-донором которых являлась *P. abies* из г. Петрозаводска, были получены 23 эмбриогенные культуры, из которых в дальнейшем сформировались клеточные линии (рис. 2б).

У всех клеточных линий часть ЭСМ была перенесена на следующую питательную среду (maturation LM), где происходило созревание соматических зародышей (рис. 3б, в). Формирование семядольных зародышей зафиксировано на 10–21 сутки культивирования, в зависимости от клеточной линии. Полученные растения размещались на субстрате germination LM. Спустя некоторое время у части растений (20%) начинали формироваться корни (рис. 3г). Таким образом, за 3 месяца исследования процесса СЭ были получены растения-регенеранты *P. abies*.

Спустя 14 месяцев культивирования из 26 клеточных линий, полученных от эксплантов *P. abies* из Петрозаводской ЛСП, сохранилось 12 шт. (46%), а из эксплантов *P. abies* г. Петрозаводска – 2 клеточные линии (9%). Часть культур была подвержена грибковой инфекции, а другая часть переставала развиваться, темнела и погибала. Наиболее активными пролиферативными способностями обладали клеточные линии, полученные из эксплантов клонов плюсовых деревьев № 3 и 7 (рис. 2б), которые сохранили способность к образованию растений-регенерантов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение вегетативного потомства хвойных растений методом СЭ активно развивается [4]. Предполагается, что в ближайшем будущем СЭ будет внедрен в селекционные программы стран Европы, что поспособствует преодолению проблем в лесном секторе, вызванных изменением климата и высоким спросом на продукцию из древесины.

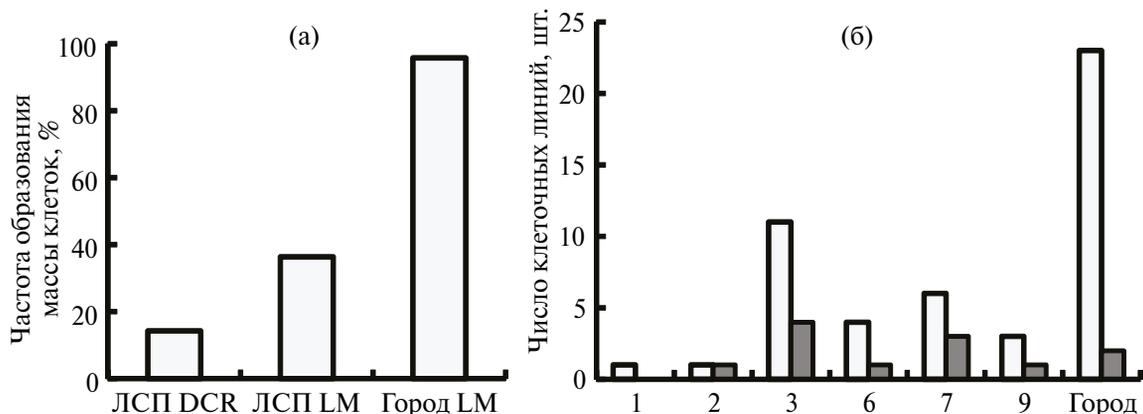


Рис. 2. Частота образования массы клеток (а) из зародышей *Picea abies*, собранных с деревьев на Петрозаводской лесосеменной плантации (ЛСП) и в г. Петрозаводске; б – число клеточных линий. Светлые столбцы – клеточные линии, сформированные в летний сезон 2022 г.; темные столбцы – клеточные линии, сохранившиеся спустя 14 месяцев культивирования.

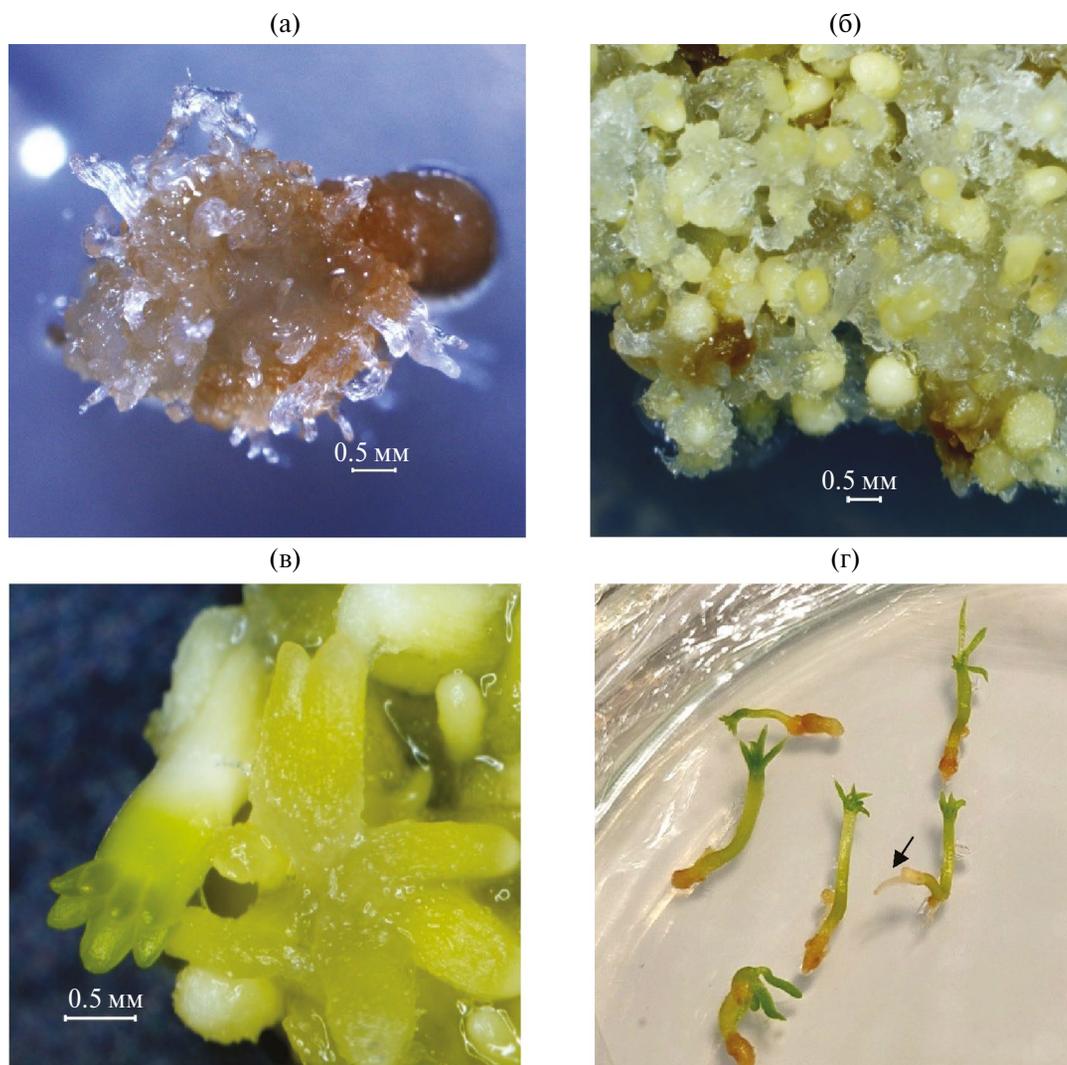


Рис. 3. Получение соматических растений *Picea abies*: а – инициация эмбриогенной культуры; б – глобулярные соматические зародыши на питательной среде maturation LM; в – вызревание соматического зародыша; г – растения-регенеранты на питательной среде germination LM (стрелкой обозначен сформированный корень). Масштаб – 0.5 мм.

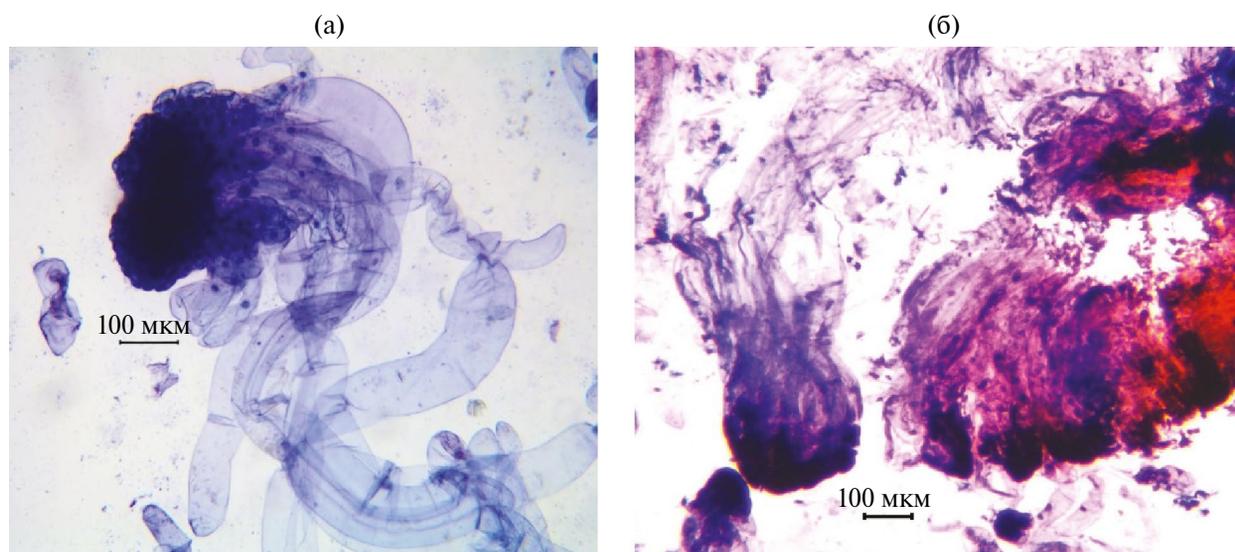


Рис. 4. Формирование соматических зародышей в эмбрионально-суспензорной массе *Picea abies*. Масштаб – 100 мкм.

Считается, что как зрелые, так и незрелые зиготические зародыши могут быть использованы в качестве эксплантов при инициации эмбриогенных культур *Picea*, хотя частота инициации у зрелых эмбрионов ниже, по сравнению с незрелыми [9, 24]. Так на *P. abies* было показано, что из незрелых зародышей формирование масс клеток достигает 100%, в то время, как из зрелых – 50% [25]. Для *P. abies* [26] и *P. mariana* [15] характерна более активная индукция СЭ из зиготических зародышей на этапе раннего эмбриогенеза на посткливажной стадии развития (культура мегагаметофитов). В то же время у *P. sitchensis* частота индукции СЭ составляла от 3 до 5% при использовании эксплантов как зрелых, так и незрелых зиготических зародышей [12, 13]. Установлено, что ЭСМ у *P. pungens* образуется из незрелых зиготических зародышей на стадии сформированных семядолей [27]. Представленные данные свидетельствуют о необходимости разработки видоспецифичных протоколов индукции СЭ для представителей рода *Picea*.

По нашим данным, в 2022 г. для среднетаежной подзоны Карелии оптимальным сроком для сбора шишек *P. abies* являлся период – конец июля–август. В этот период зиготический зародыш развивался из глобулярного в семядольный. При поздних сроках сбора растительного материала (сентябрь), помимо снижения частоты инициации из-за вызревания зародышей, пораженные вредителями шишки могут уже не содержать семян, что делает невозможным размножение растений как естественным путем, так и с помощью СЭ. Поэтому ранний сбор и хранение шишек при низких положительных температурах в холодильнике замедляет развитие зиготического зародыша, продлевая период введения материала в культуру без снижения частоты инициации, а также оказывает негативное влияние на развитие личинок вредителя, что способствует сохранению большей части семян. Отметим, что развитие личинок огневки шишковидной в шишках *P. abies* делает невозможным сбор семян с деревьев, произрастающих на Петрозаводской ЛСП на протяжении нескольких лет. Семена, собранные с клонов плюсовых деревьев на плантации, могли бы послужить качественным посадочным материалом для целей лесовосстановления в среднетаежных лесах Европейского Севера России. В связи с этим проведение исследований по искусственному размножению ценных генотипов хвойных растений с определенных географических районов и их сохранению в культуре *in vitro* является особенно актуальным.

Модификация протоколов и подбор условий культивирования до сих пор остается важнейшим этапом для успешного запуска СЭ. К ним относят протоколы по предварительной стерилизации растительного материала перед введе-

нием эксплантов в культуру *in vitro* и состав питательной среды. В литературе [24, 28] отмечается, что стресс, вызванный химическим и физическим воздействием на клетки экспланта, может способствовать укорачиванию теломер, а это, в свою очередь, оказывает негативное влияние на процесс СЭ. Для растений рода *Picea* наиболее часто используемыми и рекомендуемыми питательными средами являются LP [29] и LM [4, 21]. В нашем исследовании мы инокулировали зародыши *P. abies* на два субстрата, значительно отличающихся по составу. Показано, что питательная среда DCR не подходит для запуска СЭ *P. abies* – на ней формировался неэмбриогенный каллус. Похожие результаты были получены нами и при введении мегагаметофитов *Pinus sylvestris* L., содержащих незрелые зародыши [30, 31]. Интересно, что в работе Третьяковой с соавт. [19], где в культуру *in vitro* вводили зародыши *P. obovata* на 4 различных субстрата – DCR, 1/2LV, MS, AI, активной способностью к пролиферации обладали только 3 клеточные линии из 300, при этом большая часть ЭСМ культивировалась на питательной среде DCR.

В нашем эксперименте после среды пролиферации клеточные линии переносили на среду созревания и культивировали при 16-часовом фотопериоде. В литературе [32–34] представлена информация о том, что перед началом созревания зародышей хвойных растений на короткий период времени можно использовать субстрат, не содержащий регуляторы роста, с добавлением активированного угля (предсозревание). Помимо этого, для снижения осмотического потенциала питательной среды в нее добавляют полиэтиленгликоль [34–36]. Это может оказывать положительное влияние на созревание соматических зародышей. Также некоторые исследователи [33, 37] рекомендуют выращивать культуры хвойных растений на среде созревания в темноте. Перечисленные выше модификации протоколов культивирования эмбриогенных линий, вероятно, могут способствовать лучшему формированию растений-регенерантов.

На успех инициации СЭ существенное влияние оказывает генотип дерева-донора. Aronen с соавт. [24] показали, что инициация СЭ у эксплантов *P. abies* от контролируемого опыления варьировала в зависимости от генотипа, а также отличалась год от года и составляла 61–100% в 2012 г., и 30–94% в 2014 г. В нашем исследовании ЭСМ были получены для всех деревьев, с которых удалось собрать неповрежденный семенной материал. При этом наибольшее число эмбриогенных клеточных линий было образовано для клонов плюсовых деревьев № 3 и 7, а также для дерева из г. Петрозаводска – 23 клеточные линии. Через 14 месяцев с начала культивирования от данных деревьев-доноров активную пролиферацию про-

должили 36% (дерево № 3), 50% (дерево № 7) и 9% (дерево из г. Петрозаводска) клеточных линий от первоначально образованных. В работе Hazubska-Przybyl и Wojarczuk [11] показано, что спустя 24 месяца культивирования способностью к активному делению обладали 9% эмбриогенных культур *P. abies*. Таким образом, можно заключить, что генотип дерева-донора эксплантов оказывает влияние не только на инициацию СЭ, но и на последующую выживаемость клеточных линий.

В результате проведенных исследований были адаптированы протоколы различных этапов СЭ для эксплантов с деревьев-доноров *P. abies*, произрастающих в среднетаежной подзоне Карелии. Установлено, что незрелые зиготические зародыши, отобранные в качестве эксплантов при сумме эффективных температур 728–1126 градусо-дней (при базовой температуре 5°) и хранившиеся при низких положительных температурах в течение 3–4 недель, наиболее отзывчивы к СЭ. Выявлены генотипы клонов плюсовых деревьев, произрастающих на Петрозаводской ЛСП, способные к образованию ЭСМ, длительной пролиферации и формированию растений-регенерантов. Полученные данные свидетельствуют о высокой репродуктивной способности некоторых генотипов *P. abies*, произрастающих на Петрозаводской ЛСП, и важности проведения исследований по их массовому тиражированию с перспективой дальнейшего использования данных генотипов в качестве растительного материала для целей лесовосстановления на Европейском Севере России.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института леса – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук” за помощь в сборе полевого материала и лично старшему химику лаборатории аналитической С.И. Тихомировой за помощь при культивировании клеточных линий ели европейской.

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по государственному заданию Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук” (Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pintilii R.-D., Andronache I., Diaconu D.C., Dobrea R.C., Zelěnková M., Fensholt R., Peptenatu D., Drăghici C.-C., Ciobotaru A.-M. Using fractal analysis in modeling the dynamics of forest areas and economic impact assessment: maramures, county, romania, as a case study // *Forests*. 2017. V. 8. P. 25. <https://doi.org/10.3390/f8010025>
2. Keenan R.J., Reams G.A., Achard F., de Freitas J.V., Grainger A., Lindquist E. Dynamics of global forest area: results from the fao global forest resources assessment // *For. Ecol. Manag.* 2015. V. 352. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.06.014>
3. Singha K., Sahariah D., Saikia A. Shrinking forest and contested frontiers: a case of changing human-forest interface along the protected areas of Nagaon District, Assam, India // *Eur. J. Geogr.* 2019. V. 10. P. 120.
4. Hazubska-Przybyl T., Wawrzyniak M.K., Kijowska-Oberc J., Staszak A.M., Ratajczak E. Somatic embryogenesis of Norway spruce and Scots pine: possibility of application in modern forestry // *Forests*. 2022. V. 13. P. 155. <https://doi.org/10.3390/f13020155>
5. Välimäki S., Teyssier C., Tikkinen M., Delile A., Boizot N., Varis S., Lelu-Walter M.-A., Aronen T. Norway spruce somatic embryogenesis benefits from proliferation of embryogenic tissues on filter discs and cold storage of cotyledonary embryos // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 1031686. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1031686>
6. Chalupa V. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. // *Commun. Inst. For. Cech.* 1985. V. 14. P. 57.
7. Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S., Eriksson T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // *Plant Sci.* 1985. V. 38. P. 53. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90079-2)
8. Nagmani R., Bonga J.M. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua* // *Can. J. For. Res.* 1985. V. 15. P. 1088. <https://doi.org/10.1139/x85-177>
9. Varis S. Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst // Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants / Eds. S. Jain, P. Gupta. Springer. 2018. P. 225
10. Hazubska-Przybyl T., Ratajczak E., Obarska A., Pers-Kamczyc E. Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 3394. <https://doi.org/10.3390/ijms21093394>
11. Hazubska-Przybyl T., Wojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* “Glauca” and *P. breweriana*) // *Acta Soc. Bot. Pol.* 2008. V. 77. P. 189. <https://doi.org/10.5586/asbp.2008.023>
12. Krogstrup P., Eriksen E.N., Moller J.D., Roulund H. Somatic embryogenesis in sitka spruce (*Picea sitchensis*)

- sis (Bong.) Carr.) // Plant Cell Rep. 1988. V. 7. P. 594. <https://doi.org/10.1007/BF00272766>
13. von Arnold S., Woodward S. Organogenesis and embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea sitchensis* // Tree Physiol. 1988. V. 4. P. 291. <https://doi.org/10.1093/treephys/4.3.291>
 14. Hazubska T., Szczygiel K. Induction of somatic embryogenesis in spruce: *Picea omarika*, *P. pungens* "Glauca", *P. breweriana* and *P. abies* // Dendrobiologia. 2003. T. 50. P. 17. <https://doi.org/10.5586/asbp.2008.023>
 15. Lelu M.-A., Bornman C.H. Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea abies* and *Picea mariana* // Plant Physiol. Biochem. 1990. V. 28. P. 785.
 16. Liao Y.K., Liao C.K., Ho Y.L. Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morrisonicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008. P. 257. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9371-3>
 17. Li C.H., Liu B.G., Kim T.D., Moon H.K., Choi Y.-E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite genotypes of *Picea koraiensis* // Plant Biotechnol. 2008. V. 2. P. 259. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0073-4>
 18. Шалаев Е.А., Третьякова И.Н. Индукция соматического эмбриогенеза у ели аянской в культуре *in vitro* // Хвойные бореальной зоны. 2011. Т. 28. № 1-2. С. 69.
 19. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Пахомова А.П., Шевелева И.С., Муратова Е.Н. Индукция соматического эмбриогенеза у ели сибирской (*Picea obovata*) в культуре *in vitro* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. Т. 54. С. 6. <https://doi.org/10.17223/19988591/54/1>
 20. Gupta P.K., Durzan D.J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Rep. 1985. V. 4. P. 177.
 21. Litvay J.D., Verma D.C., Johnson M.A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Rep. 1985. V. 4. P. 325.
 22. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В. Особенности инициации эмбриоидов из мегагаметофитов *Pinus sibirica* в культуре *in vitro* // Онтогенез. 2014. Т. 45. С. 112. <https://doi.org/10.7868/s0475145014020074>
 23. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 29. С. 180.
 24. Aronen T., Virta S., Varis S. Telomere length in Norway spruce during somatic embryogenesis and cryopreservation // Plants. 2021. V. 10. P. 416. <https://doi.org/10.3390/plants10020416>
 25. von Arnold S., Clapham D., Egertsdotter U., Mo L.H. Somatic embryogenesis in conifers – a case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies* // Plant Growth Regul. 1996. V. 20. P. 3.
 26. Krogstrup P. Embryolike structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*) // Can. J. For. Res. 1986. V. 16. P. 664. <https://doi.org/10.1139/x86-116>
 27. Железниченко Т.В., Новикова Т.И. Влияние аскорбиновой кислоты и глутатиона на индукцию соматического эмбриогенеза *Picea pungens* Engelmann // Turczaninowia. 2017. Т. 20. №. 3. С. 27. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.20.3.4>
 28. Chatelain M., Drobniak S.M., Szulkin M. The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: a metaanalysis // Ecol. Lett. 2020. V. 23. P. 381. <https://doi.org/10.1111/ele.13426>
 29. von Arnold S.V., Eriksson T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta* // Can. J. Bot. 1981. V. 59. P. 870.
 30. Еришова М.А., Игнатенко Р.В., Новичонок Е.В., Чирва О.В., Галибина Н.А. Оптимизация условий стерилизации и культивирования эксплантов *Pinus sylvestris* (Pinaceae) // Растительные ресурсы. 2022. Т. 58. С. 431. <https://doi.org/10.31857/S0033994622040057>
 31. Ignatenko R.V., Chirva O.V., Ershova M.A., Galibina N.A. Some problems arising during the initiation of somatic embryogenesis in *Pinus sylvestris* L. // Environ. Sci. Proc. 2022. V. 22. P. 48. <https://doi.org/10.3390/IECF2022-13364>
 32. von Aderkas P., Label P., Lelu M.A. Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch // Tree Physiol. 2002. V. 22. С. 431. <https://doi.org/10.1093/treephys/22.6.431>
 33. Szczygiel K., Hazubska-Przybyl T., Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix* // Acta Soc. Bot. Pol. 2007. V. 76. P. 7. <https://doi.org/10.5586/asbp.2007.001>
 34. Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43. №. 6. С. 425.
 35. Stasolla C., Kong L., Yeung E.C., Thorpe T.A. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2002. V. 38. P. 93. <https://doi.org/10.1079/IVP2001262>
 36. Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W., Sederoff R.R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 49. <https://doi.org/10.1104/pp.015214>
 37. Häggman H., Jokela A., Krajnakova J., Kauppi A., Niemi K., Aronen T. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction // J. Exp. Bot. 1999. V. 50. P. 1769. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.341.1769>

УДК 581.1

ВОЗРАСТНЫЕ И АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ДЫХАНИЯ ЛИСТЬЕВ ЗИМНЕ-ЗЕЛЕННОГО ТРАВЯНИСТОГО РАСТЕНИЯ *Ajuga reptans* L. В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ ТАЕЖНОЙ ЗОНЫ

© 2024 г. М. А. Шелякин^{а,*}, Е. В. Силина^а, Т. К. Головки^а

^аИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, Россия
*e-mail: shelyakin@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 14.06.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 09.08.2023 г.

Онтогенетическое развитие и условия среды являются основными факторами, определяющими жизнедеятельность растений. Исследовали активность антиоксидантных ферментов и дыхательных путей в розеточных листьях летне-зимне-зеленого травянистого многолетника *Ajuga reptans* L. (живучка ползучая) в связи с возрастом и перезимовкой. Сформированные в мае–июне листья перезимовывали и вновь функционировали вплоть до появления новой генерации листьев. Содержание продуктов липопероксидации и пероксида водорода в листьях перезимовавших растений было достоверно выше, чем до перезимовки. Активность антиоксидантных ферментов изменялась разнонаправлено. Повышенный уровень активности аскорбатпероксидазы (APX) отмечали сразу после выхода растений из-под снега, каталазы (CAT) – до и в период перезимовки, супероксиддисмутазы (SOD) – до, в период и сразу после перезимовки. На нативных гелях идентифицировали Mn-SOD, Fe-SOD и три изоформы Cu/Zn-SOD, две изоформы APX и одну – CAT. Скорость дыхания, измеренная при 20°C, была максимальной у молодых растущих листьев и снижалась в 3–4 раза к завершению жизненного цикла. Величина соотношения способности цитохромного и альтернативного дыхательных путей изменялась в пределах от 3 до 1 и менее. Коэффициент энергетической эффективности дыхания ($Y_{\text{АТФ/глюкоза}}$, количество молей АТФ, образующихся при окислении в дыхании 1 моля глюкозы) варьировал в пределах от 17 до 25, снижаясь в период перезимовки и на завершающих этапах онтогенеза. Результаты анализа главных компонент свидетельствуют о взаимосвязи исследованных показателей и вовлеченности закономерных изменений про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания в процесс адаптации растений, зимующих с зелеными листьями. В совокупности полученные данные дополняют и углубляют представления о физиологических механизмах, способствующих перезимовке и сохранению фотосинтетического аппарата.

Ключевые слова: *Ajuga reptans*, зимне-зеленые листья, дыхание, дыхательные пути, энергетическая эффективность дыхания, адаптация

DOI: 10.31857/S0015330324010052, EDN: NWDDHY

ВВЕДЕНИЕ

Онтогенетическое развитие растительно-го организма генетически детерминировано. Оно реализуется с участием целой системы сигнальных путей, механизмов и процессов, функционирование которых в значительной

степени зависит от условий внешней среды. В сезонном климате умеренного пояса влияние внешних факторов наиболее значимо для растений, зимующих с зелеными листьями. Зимнезеленость – важный признак растений, ассоциированный с адаптивными процессами, направленными на сохранение фотосинтетического аппарата (ФСА) в период перезимовки. Ранее нами было установлено, что у зимующих листьев травянистого многолетника *Ajuga reptans* L. этому способствует диссоциация пигмент-белковых комплексов фотосистем,

Сокращения: АОХ – альтернативная оксидаза; АП – альтернативный путь дыхания; ФСА – фотосинтетический аппарат; ЦП – цитохромный путь дыхания; ЭЭД – энергетическая эффективность дыхания; АРХ – аскорбатпероксидаза; КАТ – каталаза; SOD – супероксиддисмутаза; ТВАРС – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой.

снижение содержания хлорофиллов, накопление антоцианов, повышение уровня дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла и тепловой диссипации поглощенной световой энергии, снижение фотохимической эффективности ФС II [1, 2].

Известно, что в большинстве случаев неблагоприятные воздействия факторов среды являются причиной избыточного накопления АФК в клетках и развития окислительного стресса. Это приводит к торможению роста, снижению продуктивности и даже гибели растений. В то же время АФК и продукты их взаимодействия являются важными компонентами сигнальных путей, участвующих в запуске и развитии адаптивных реакций [3]. Существенную роль в поддержании физиологически приемлемых концентраций АФК в клетках играет антиоксидантная система и ее ключевые компоненты – антиоксидантные ферменты. Антиоксидантная система в совокупности с другими механизмами защиты, позволяет растениям успешно реализовывать генетически обусловленную программу онтогенеза [4, 5].

Дыхание снабжает растительный организм энергией и метаболитами в соответствии с этапом онтогенетического развития и изменениями условий среды [6]. Вовлечение альтернативного пути дыхания (АП) способствует координации механизмов адаптации фотосинтезирующей клетки. АП участвует в регуляции редокс-баланса и контроле генерации АФК [7, 9], защищая тем самым ФСА [6, 10, 11]. Вовлечение АП приводит к снижению выхода энергии при окислении дыхательного субстрата [12]. При АП ток e^- минует комплексы III и IV митохондриальной ЭТЦ, связанные с образованием протонного потенциала, являющегося мерой свободной энергии, которая реализуется в синтезе АТФ с участием АТФ-синтазы [13]. Мы полагаем, что исследования функционирования антиоксидантной системы и дыхания листьев могут существенно дополнить и углубить представления о защитных механизмах, способствующих перезимовке растений и сохранению ФСА.

Целью данной работы было изучить динамику изменения компонентов про-/антиоксидантного метаболизма, активности дыхательных путей и энергетической эффективности дыхания в жизненном цикле розеточных листьев травянистого летне-зимне-зеленого растения *Ajuga reptans* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ajuga reptans L. (живучка ползучая) – летне-зимне-зеленый травянистый многолетник сем. Lamiaceae со сложным онтогенезом, включающим смену вегетативных поколений. На северной границе ареала большинство растений

являются побегами вегетативного происхождения (раметами) [14]. В подзоне средней тайги европейского северо-востока России растения перезимовывают под слоем снега. После схода снега в конце апреля – начале мая растения появляются с зелеными листьями, которые в июне заменяются новой генерацией листьев. Перезимовавшие листья являются источником продуктов текущего фотосинтеза, реутилизируемых органических соединений и минеральных элементов для соцветий и формирующихся молодых розеточных листьев.

Исследования проводили в 2017–2022 гг. Растения *A. reptans* произрастали в смешанном елово-осиновом лесу в окрестностях г. Сыктывкара (61°3' с. ш., 50°33' в. д.). Среднегодовая температура воздуха в районе исследований 1°C, среднесуточная температура самого теплого месяца (июля) 17°C, самого холодного (января) – минус 16°C.

Образцы листьев отбирали со средней части розетки побегов: 1) вновь формирующиеся, активно растущие листья (июнь); 2) функционально зрелые, завершившие рост листья (июль); 3) зрелые листья перед перезимовкой (конец сентября); 4) зрелые листья в период перезимовки (декабрь) и 5) после выхода растений из-под снега (конец апреля); 6) перезимовавшие функционально активные листья (середина мая); 7) стареющие листья на завершающих этапах жизненного цикла растений (начало июня).

Часть растительного материала фиксировали в жидком азоте для определения показателей про-/антиоксидантного статуса листьев. Дыхание измеряли у свежесобранных листьев.

Измерение показателей про-/антиоксидантного статуса листьев. Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARS) [15]. Оптическую плотность регистрировали при длинах волн 532 и 600 нм. Количество TBARS рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 156$ мМ/см после вычитания неспецифического поглощения при 600 нм и выражали в мкмоль/г сырой массы. Содержание H_2O_2 определяли хемилюминесцентным методом, основанном на перекисном окислении люминола [16]. Уровень хемилюминесценции регистрировали с помощью хемилюминометра [17]. Количество H_2O_2 рассчитывали по графику градуировочной зависимости и выражали в мкмоль/г сырой массы. Проверку на специфичность проводили по ингибированию образования H_2O_2 добавлением каталазы (“Sigma”, США). Общую активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли по способности фермента подавлять фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) (“DDL”, США) [18]. Поглощение ре-

гистрировали при длине волны 560 нм. Активность аскорбатпероксидазы (APX) определяли при длине волны 290 нм по изменению оптической плотности раствора в результате окисления аскорбата [19]. Активность APX рассчитывали, используя коэффициент экстинкции аскорбата $\epsilon = 2.8$ мМ/см и выражали в мкмоль аскорбата/мг белка мин. Активность каталазы (CAT) измеряли при длине волны 240 нм по количеству разложившегося H_2O_2 (“Sigma”, США) за единицу времени [20], рассчитывали, используя коэффициент экстинкции H_2O_2 ($\epsilon = 0.0436$ мМ/см) и выражали в мкмоль H_2O_2 /мг белка мин. Содержание растворимого белка анализировали по методу Бредфорда [21], используя в качестве стандарта БСА (“Sigma”, США). Процедуры выделения белка проводили при температуре 4°C.

Определение активности изоформ антиоксидантных ферментов. Для определения изоферментного состава SOD, APX и CAT применяли метод нативного электрофореза в полиакриламидном геле (12.5% для SOD, 10% для APX и CAT). Нативный форез проводили при температуре 4°C и при стабильном токе 180 В, как описано в работе [22]. В карман геля вносили от 10 до 20 мкг белка. Для визуализации изоформ SOD гели инкубировали в фосфатном буфере с добавлением рибофлавина и нитросинего тетразолия в темноте [18]. Через 30 мин гели переносили на свет до появления светлых полос на фиолетовом фоне. Для идентификации изоформ SOD использовали ингибиторный анализ [22]. Для каждого ингибиторного анализа получали новый гель с разделенными белками. Для ингибирования Cu/Zn-SOD и Fe-SOD в окрашивающий буфер добавляли 5 мМ H_2O_2 , для Cu/Zn-SOD – 3 мМ KCN. Для визуализации изоформ APX гели последовательно инкубировали в фосфатном буфере, содержащем 2 мМ аскорбата, затем – 4 мМ аскорбата и 1 мМ H_2O_2 [23]. Окрашивание гелей проводили в фосфатном буфере с добавлением 14 мМ TEMED (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин) (“Alfa Aesar”, Германия) и 2.45 мМ НСТ до появления светлых полос на фиолетовом фоне, свидетельствующих об активации APX. Активность изоформ CAT на гелях определяли по методу, основанному на восстановлении гексацианоферрата калия (III) до гексацианоферрата калия (II) и последующей реакцией гексацианоферрата калия (II) с хлоридом железа (III) с образованием окрашенного соединения [24]. Гели помещали в 4 мМ раствор H_2O_2 , промывали дистиллированной водой и окрашивали в 1% (мас./об.) растворе FeCl_3 (“Fisher Chemical”, Великобритания) и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (“Лабтех”, Россия). Для обработки изображений белковых профилей изоформ антиоксидантных ферментов на гелях использовали гель-документирующую систему

GelDoc-ChemiDocXRS (“Bio-Rad”, США) и программное обеспечение Quantity One Analysis Software, Version 4.6.9. (“Bio-Rad”, США). В расчетах использовали показатель средней плотности пикселей полос за вычетом значений плотности пикселей фона геля.

Все биохимические анализы проводили в 2–3-кратной аналитической повторности на 3–4 независимых образцах.

Измерения активности дыхания и дыхательных путей. Скорость дыхания листьев определяли по поглощению O_2 в темноте при 20°C полярографически с помощью Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Англия). Высечки средней части свежесобранных листьев помещали в реакционный сосуд, содержащий буферный раствор HEPES (“Helicon”, Россия) (50 мМ, pH 7.2). Скорость отдельных дыхательных путей определяли с добавлением специфических ингибиторов, оптимальные концентрации которых были подобраны в предварительных экспериментах. В качестве ингибитора альтернативной оксидазы (АОХ) использовали 8 мМ раствор салицилгидроксамовой кислоты (“Lancaster”, Англия). Активность цитохромоксидазы подавляли 6 мМ раствором KCN (“Sigma”, США).

Интенсивность общего дыхания образцов определяли по скорости поглощения O_2 тканями без добавления ингибиторов. Ингибиторы дыхательных путей добавляли последовательно после измерения интенсивности общего поглощения O_2 . Скорость поглощения кислорода представляли в виде суммы отдельных компонент и выражали в нмоль O_2 /г сухой массы мин: $V_t = V_{\text{alt}} + V_{\text{cy}} + V_{\text{res}}$, где V_t – общее дыхание; V_{alt} – альтернативное дыхание, подавляемое ингибитором АОХ салицилгидроксамовой кислотой, V_{cyt} – цитохромное (цианидчувствительное) дыхание; V_{res} – остаточное дыхание, регистрируемое в присутствии ингибиторов альтернативного и цитохромного дыхательных путей (ЦП). Определения проводили в 4–7-кратной биологической повторности.

Энергетическую эффективность дыхания (ЭДД) листьев оценивали, рассчитывая коэффициент $Y_{\text{АТФ/глюкоза}}$ – эффективность окисления глюкозы для образования АТФ с учетом вклада дыхательных путей, используя величины выхода АТФ при дыхании по ЦП и АП [12]. Предварительно количество поглощенного в дыхании O_2 (за вычетом компоненты остаточного дыхания) выражали в эквивалентах дыхательного субстрата (глюкозы). Согласно балансовому уравнению, поглощение 1 мг O_2 в дыхании эквивалентно окислению 0.937 мг глюкозы.

Статистическая обработка данных была проведена с использованием программы Statistica 10 (“StatSoft Inc.”, США). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия

Шапиро-Уилкса. Значимость различий между средними величинами измеряемых показателей оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, использовали критерий Дункана или непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Расчеты осуществляли при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Для оценки и визуализации возможных взаимосвязей между изменениями исследуемых показателей про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания листьев в течение их жизненного цикла использовали анализ главных компонент (PCA). Перед процедурой анализа абсолютные значения подвергали ранжированию и приводили к одним относительным значениям. Количество главных компонент (PC) определяли, используя критерий Кайзера. При анализе были выбраны компоненты с собственными значениями более 1.5. Значимыми считали переменные (показатели) с факторной нагрузкой на компоненты выше 0.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Про-/антиоксидантный статус листьев

Судя по исследованным показателям, про-/антиоксидантный статус листьев *A. reptans* довольно сильно изменялся в онтогенезе. Формирующиеся в конце мая–июне розеточные листья новой генерации отличались от зрелых (июль) более высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов, особенно SOD и CAT (табл. 1). Однако достоверных отличий между молодыми и зрелыми листьями по содержанию TBARS и H_2O_2 обнаружено не было. Перед перезимовкой (сентябрь) в зрелых листьях наблюдали существенное повышение активности SOD и CAT, в 2.7 и 1.5 раза соответственно. Активность APX увеличивалась в среднем на 40%. Зимой (декабрь), на

фоне сохранения повышенного уровня активности SOD и CAT, проявлялась тенденция к накоплению TBARS и H_2O_2 . Весной после перезимовки (апрель) содержание H_2O_2 увеличивалось почти вдвое, достигая максимальных значений за весь исследуемый период, тогда как содержание TBARS практически не изменялось. В то же время, отмечали значительное (в 2.3 раза) увеличение активности пероксидазы и существенное (в 1.7 раза) снижение активности CAT. Активность SOD сохранялась на высоком уровне. С началом активной вегетации (май) содержание H_2O_2 в перезимовавших листьях достоверно (в 1.7 раза) уменьшалось, а TBARS – почти не изменялось. Активность SOD и APX снижалась в среднем в 1.5 раза. У стареющих листьев (июнь) наблюдали значительное, более чем в 10 раз, уменьшение содержания H_2O_2 и снижение активности SOD. Активность APX практически не изменялась, а CAT повышалась в 1.5 раза.

Полученные данные свидетельствуют о снижении про-/антиоксидантного статуса листьев с возрастом и активации их про-/антиоксидантного метаболизма в связи с перезимовкой. После перезимовки проявлялась тенденция к накоплению продуктов ПОЛ и содержания H_2O_2 .

Изоферментный анализ SOD выявил наличие одной изоформы Mn-SOD, одной изоформы Fe-SOD и двух изоформ Cu/Zn-SOD у вновь формирующихся (июнь) и интенсивно растущих (июль) листьев (рис. 1а). В зрелых листьях, отобранных до (конец сентября) и во время (декабрь) перезимовки, а также сразу после схода снега (конец апреля) отмечали появление новой изоформы Cu/Zn-SOD. В перезимовавших (май) и стареющих (июнь) листьях качественный состав изоформ SOD был сопоставим с таковым молодых листьев. Согласно расчетам, минимальная активность идентифицированных изоформ SOD наблюдалась в июле, тогда как

Таблица 1. Динамика изменения показателей про-/антиоксидантного метаболизма листьев *Ajuga reptans*

Месяц	TBARS	H_2O_2	SOD	APX	CAT
VI	4.1 ± 1.0^c	0.59 ± 0.06^b	2.9 ± 0.1^c	1.8 ± 0.2^{abc}	26.2 ± 0.9^a
VII	4.9 ± 0.6^{abc}	0.44 ± 0.02^{ab}	1.8 ± 0.1^b	1.3 ± 0.2^a	18.2 ± 0.4^b
IX	4.5 ± 0.2^{ac}	0.35 ± 0.08^a	4.8 ± 0.4^a	1.8 ± 0.1^{bc}	27.8 ± 1.9^a
XII	6.2 ± 0.1^{ab}	0.56 ± 0.04^{ab}	4.9 ± 0.1^a	1.4 ± 0.1^{ab}	28.6 ± 3.1^a
IV*	6.7 ± 0.8^b	1.04 ± 0.01^d	4.6 ± 0.2^a	3.2 ± 0.4^d	16.8 ± 2.8^b
V*	6.3 ± 0.2^{ab}	0.61 ± 0.01^c	3.4 ± 0.1^d	2.0 ± 0.4^c	17.9 ± 1.2^b
VI*	5.8 ± 0.3^{abc}	0.05 ± 0.01^c	2.2 ± 0.1^b	1.6 ± 0.2^{abc}	27.1 ± 0.1^a

Примечание: содержание продуктов перекисного окисления липидов (TBARS) и H_2O_2 выражали в мкмоль/г сырой массы, активность супероксиддисмутазы (SOD) – в ед/мг белка, аскорбатпероксидазы (APX) – в мкмоль аскорбата/мг белка мин, каталазы (CAT) – в мкмоль H_2O_2 /мг белка мин. Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение года (ANOVA, критерий Дункана, $n = 8 - 9$, $P \leq 0.05$).

максимальная — до, в период и сразу после перезимовки (рис. 1а). Основной вклад (68%) в суммарную активность изоформ SOD вносили Cu/Zn-содержащие изоформы, относительная доля активности Mn-SOD составляла в среднем 26%, а на Fe-SOD приходилось не более 6%.

При анализе изоформ утилизирующих H_2O_2 ферментов в листьях *A. reptans* выявлены две изоформы APX и одна изоформа САТ (рис. 1б, в). Основной вклад в изменения суммарной активности APX вносила более подвижная изоформа — APX-2 (в среднем 60%). Относительная активность APX-2 была высокой в

молодых и перезимовавших листьях (рис. 1б). Динамика изменения относительной активности изоформы каталазы была сопоставима с изменениями общей активности фермента (рис. 1в).

Дыхание и соотношение дыхательных путей

Молодые розеточные листья *A. reptans* характеризовались высокой дыхательной активностью (табл. 2). С возрастом дыхание листьев снижалось, и у зрелых листьев перед перезимовкой скорость поглощения O_2 была на 40% ниже, чем у молодых активно растущих листьев.

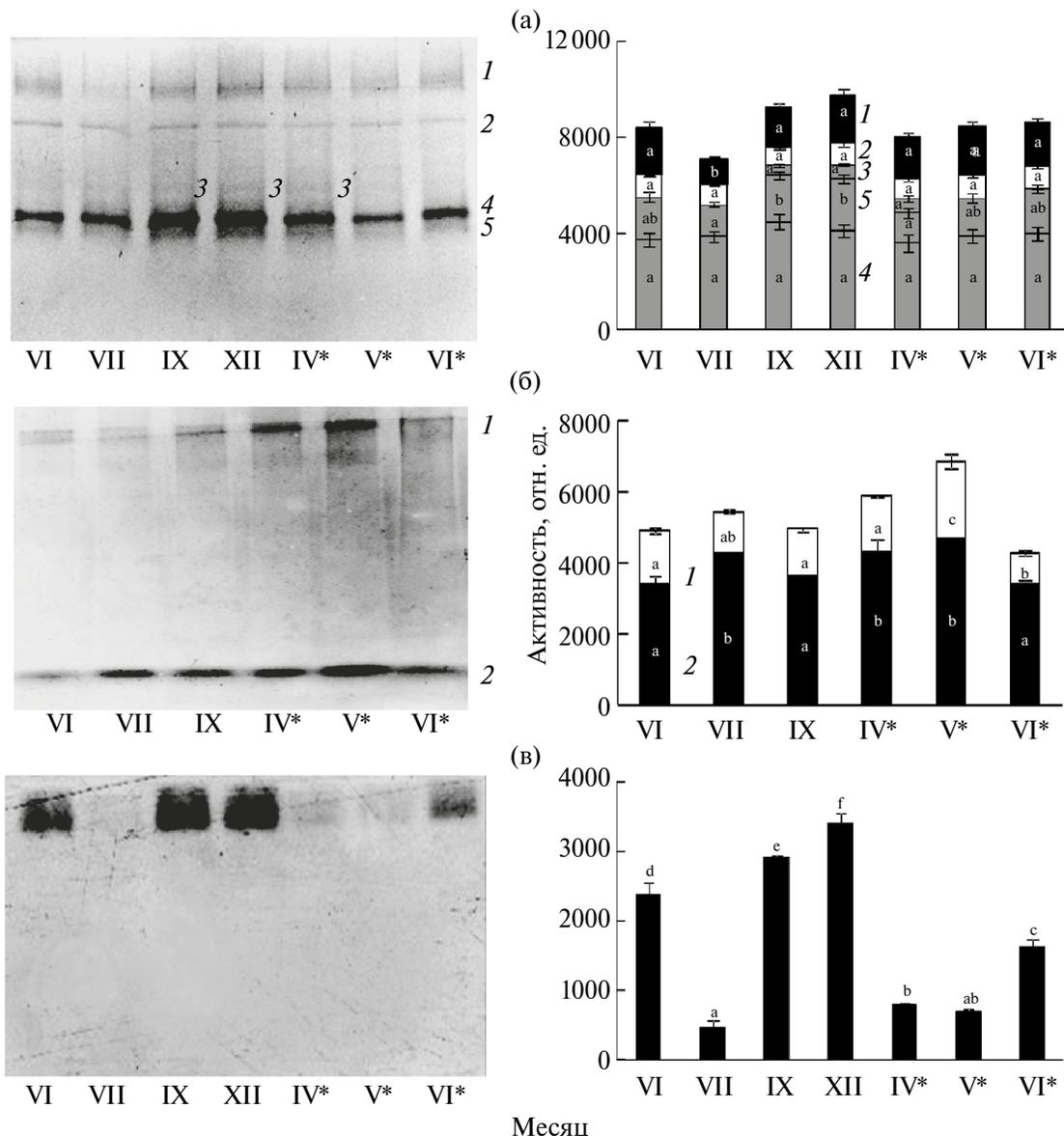


Рис. 1. Белковые профили изоформ супероксиддисмутазы (SOD) (а), аскорбатпероксидазы (APX) (б), каталазы (САТ) (в) (слева) и их относительная активность (справа) в разные периоды жизненного цикла листьев *Ajuga reptans*. Для SOD цифрами отмечены: 1 — Mn-содержащие изоформы (■), 2 — Fe-содержащие изоформы (□), 3–5 — Cu/Zn-содержащие изоформы (■). Для APX цифрами 1 и 2 отмечены изоформы APX-1 (□) и APX-2 (■) соответственно. Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические показатели относительной активности изоформ и их стандартные ошибки. Разные латинские буквы столбцов обозначают статистическую значимость различий между активностью изоформ ферментов в разные периоды жизненного цикла листьев (критерий Краскела-Уоллиса, $P < 0.05$, $n = 3-9$).

Скорость поглощения O_2 зимующих листьев (декабрь) была довольно низкой, в 1.5 ниже, чем до перезимовки. Однако сразу после схода снега и в весенний период отмечали заметное (в среднем на 30%) повышение дыхательной активности листьев. Дыхание стареющих листьев было более чем в 3 раза ниже по сравнению с формирующимися листьями новой генерации.

Результаты определения поглощения O_2 с применением ингибиторов позволили оценить способность дыхательных путей (табл. 2), их соотношение и вклад в общее дыхание (рис. 2). Скорость цитохромного пути ($V_{\text{цит}}$) превышала скорость дыхания по альтернативному пути ($V_{\text{альт}}$) у молодых и зрелых листьев до перезимовки. Величина соотношения $V_{\text{цит}}/V_{\text{альт}}$ увеличивалась по мере завершения роста листьев почти вдвое и достигала значения 2.8 у зрелых листьев в июле (табл. 2). Затем отмечали постепенное снижение этого показателя. Осенью (сентябрь) и в период перезимовки (декабрь) величина соотношения $V_{\text{цит}}/V_{\text{альт}}$ была близка к 1 вследствие снижения активности $V_{\text{цит}}$. При этом способность $V_{\text{альт}}$ была высокой в молодых листьях на фоне максимальных значений $V_{\text{цит}}$. В зрелых листьях (июль) активность $V_{\text{альт}}$ снижалась почти вдвое и вновь усиливалась перед перезимовкой (сентябрь), когда скорость $V_{\text{цит}}$ уже была в 2.5 раза ниже по сравнению со значениями, отмеченными в летний период. Затем $V_{\text{альт}}$ вновь снижалась и статистически значимо не изменялась вплоть до завершения жизненного цикла листьев. Активность ЦП возрастала почти в 2 раза после перезимовки, что приводило к повышению соотношения $V_{\text{цит}}/V_{\text{альт}}$. В период старения листьев отмечали сильное, более чем в 3 раза, падение скорости $V_{\text{цит}}$ на фоне сохранения уровня активности $V_{\text{альт}}$. В результате величина соотношения $V_{\text{цит}}/V_{\text{альт}}$ на завершающих этапах онтогенеза перезимовавших листьев снижалась до 0.6.

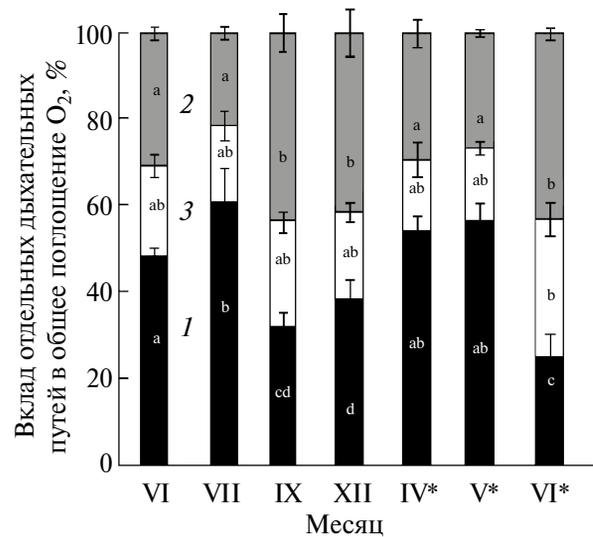


Рис. 2. Вклад дыхательных путей в общее поглощение O_2 листьями *Ajuga reptans* в разные периоды их жизненного цикла: 1 – цитохромное дыхание (■); 2 – альтернативное дыхание (▒); 3 – остаточное дыхание (□). Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение жизненного цикла (ANOVA, критерий Дункана, $n = 5-10$, $P \leq 0.05$).

Вклад ЦП в общее поглощение O_2 был наибольшим (60%) у зрелых листьев и наименьшим (25%) у стареющих листьев (рис. 2). При этом доля ЦП в общем дыхании листьев в период перезимовки была достоверно ниже, чем после перезимовки. Вклад АП в дыхание зрелых листьев составлял 30%, после перезимовки был менее 20%. В период перезимовки и на конечных этапах жизненного цикла листьев доля АП в дыхании увеличивалась до 41–44%. Остаточное

Таблица 2. Изменения интенсивности общего дыхания и дыхательных путей (нмоль O_2 /г сухой массы мин) в листьях *Ajuga reptans*

Месяц	V_t	$V_{\text{цит}}$	$V_{\text{альт}}$	$V_{\text{рес}}$	$V_{\text{цит}}/V_{\text{альт}}$
VI	2669 ± 98 ^f	1295 ± 46 ^d	820 ± 41 ^b	554 ± 69 ^e	1.6 ± 0.04 ^a
VII	1984 ± 239 ^e	1207 ± 160 ^d	425 ± 34 ^a	352 ± 69 ^{bcd}	2.8 ± 0.3 ^c
IX	1607 ± 103 ^{ad}	515 ± 55 ^c	702 ± 73 ^b	390 ± 36 ^{cd}	0.8 ± 0.1 ^b
XII	1013 ± 67 ^{bc}	391 ± 45 ^{bc}	420 ± 58 ^a	202 ± 24 ^a	1.0 ± 0.2 ^b
IV*	1403 ± 110 ^a	759 ± 52 ^a	410 ± 45 ^a	233 ± 58 ^{ab}	1.9 ± 0.1 ^a
V*	1290 ± 73 ^{ac}	729 ± 54 ^a	342 ± 12 ^a	219 ± 19 ^{ab}	2.1 ± 0.2 ^a
VI*	813 ± 60 ^b	206 ± 44 ^b	350 ± 11 ^a	257 ± 29 ^{abc}	0.6 ± 0.1 ^b

Примечание: V_t – общее дыхание, $V_{\text{цит}}$ – цитохромное дыхание, $V_{\text{альт}}$ – альтернативное дыхание, $V_{\text{рес}}$ – немитохондриальное остаточное дыхание. Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение года (ANOVA, критерий Дункана, $n = 5 - 10$, $P \leq 0.05$).

дыхание, не подавляемое ингибиторами терминальных оксидаз митохондрий, составляло в среднем 20% и повышалось до 30% в период старения листьев.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении скорости общего дыхания и дыхательных путей в онтогенезе листа. При этом соотношение дыхательных путей изменялось существенно. Перезимовка усиливала вовлечение АП, а возобновление жизнедеятельности растений после перезимовки было сопряжено с повышением активности ЦП листьев.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами выявлены закономерности изменения про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания в онтогенезе зимующих розеточных листьев летне-зимне-зеленого травянистого многолетника *Ajuga reptans*. Судя по увеличению содержания в листьях TBARS и H_2O_2 , перезимовка индуцировала развитие окислительного стресса. Усиление ПОЛ мембран является универсальной реакцией растений на действие низких температур [25]. Накопление пероксида водорода потенциально опасно для клеток, так как в присутствии ионов металлов с переходной валентностью молекулы H_2O_2 служат источником гидроксильного радикала ($HO\cdot$) (реакция Хабера-Вайса). Вследствие высокой реакционной способности $HO\cdot$ способен инициировать различные цепные реакции, повреждая липиды, белки, нуклеиновые кислоты [5]. После перезимовки содержание TBARS и H_2O_2 постепенно стабилизировалось, возвращаясь к уровню, отмеченному у зрелых листьев до перезимовки. По-видимому, наблюдаемые изменения свидетельствуют не только о развитии окислительного стресса, но могут также отражать сигнальную функцию продуктов ПОЛ и H_2O_2 при адаптации к стрессу, вызванному перезимовкой [3]. Интересно отметить очень низкое содержание H_2O_2 (при сохранении сравнительно высокого уровня липопероксидации) в листьях на завершающих этапах жизненного цикла. Это может быть связано с их старением и присущими этому явлению изменениями метаболизма, о чем свидетельствует депрессия дыхания и изменение соотношения дыхательных путей во время старения (табл. 2, рис. 2).

Накопление АФК контролируется антиоксидантной системой клетки. Нами установлено, что молодые листья *A. reptans* характеризовались сравнительно высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов, особенно SOD и CAT (табл. 1). Это важно для защиты фотосинтезирующих клеток от АФК в период формирования ФСА. Существенное повышение активности SOD, CAT и APX связано с перезимовкой.

Шоковое воздействие комплекса неблагоприятных факторов среды и, в первую очередь, низкие температуры приводят к развитию окислительного стресса, о чем свидетельствует повышение уровня ПОЛ и накопление H_2O_2 , особенно ранней весной сразу после схода снежного покрова. Активность SOD сохранялась на высоком уровне длительный период, начиная с осени (сентябрь) и до весны (апрель). Показано, что повышенная активность SOD обеспечивает растениям высокую устойчивость к низкотемпературному стрессу [25, 26]. SOD контролирует уровень супероксид-радикала путем его дисмутации до молекулярного кислорода и H_2O_2 [27]. В листьях *A. reptans* обнаружено пять изоформ SOD (Mn-SOD, Fe-SOD и три Cu/Zn-SOD). По данным литературы [4, 27] Mn-SOD локализуется в матриксе митохондрий и пероксисомах, Fe-SOD – в стромах и мембранах тилакоидов хлоропластов, а Cu/Zn-SOD присутствует в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и апопласте. Увеличение общей активности SOD в листьях *A. reptans* было связано с повышением активности всех обнаруженных нами типов SOD, но основной вклад вносили Cu/Zn-содержащие изоформы. Появление дополнительной изоформы Cu/Zn-SOD в зимне-весенний период, по-видимому, направлено на торможение развития окислительного стресса. Существует мнение, что изменение активности и изоферментного состава Cu/Zn-SOD связаны с устойчивостью к множественным стрессам [28]. APX и CAT являются ферментами, нейтрализующими H_2O_2 в клетках растений [29]. Увеличение активности APX отмечали в весенний период, когда содержание H_2O_2 было максимальным. Как известно, изоформы APX присутствуют в стромах и тилакоидной мембране хлоропластов, а также в пероксисомах и цитоплазме [29]. Нами идентифицированы две изоформы APX, основной вклад в общую активность вносила более подвижная, вероятно, цитозольная изоформа. Активность CAT была высокой в молодых и зрелых листьях непосредственно до и в период перезимовки. Значительное повышение активности CAT отмечали у стареющих листьев, что сопровождалось уменьшением содержания H_2O_2 . По данным литературы, этот фермент локализован преимущественно в пероксисомах, но обнаружен также в цитозоле и клеточной стенке [5, 29]. В листьях *A. reptans* CAT была представлена только одной изоформой, вероятно, пероксисомальной. Видимо, выявленные различия в динамике активности APX и CAT связаны с разным сродством ферментов к H_2O_2 . В совокупности полученные данные об уровне активности и изоферментном составе антиоксидантных ферментов свидетельствуют об адаптивном характере их изменений, направленных на торможение развития окисли-

тельного стресса и поддержание редокс-баланса клеток зимующих зелеными листьями.

Среди процессов, реализующих способность растений программировать метаболизм и энергетику клеток в соответствии с этапом онтогенетического развития и изменениями условий среды, ключевая роль принадлежит дыханию [30]. Подавляющая часть дыхания (60–70%) молодых интенсивно растущих растений (органов) связана с ростом, а у зрелых преобладает дыхание на поддержание структурной целостности и функциональной активности клеток и тканей. Выявлено, что динамика дыхания листьев *A. reptans* была обусловлена, главным образом, изменением активности энергетически эффективного ЦП (табл. 2, рис. 2). Это соответствует представлениям о том, что ЦП связан с функциональной составляющей дыхания роста, тогда как энергетически малоэффективный АП является компонентом дыхания поддержания [31]. Следует отметить, что молодые, быстро растущие листья *A. reptans* характеризовались сравнительно высокой способностью к АП. Сходные результаты были получены ранее для листьев зимне-зеленых растений бадана [32] и живучки [33]. Вероятно, это связано с участием АП в поддержании баланса между скоростью электронного транспорта и соотношением АТФ/АДФ, контролирующим активность основного цитохромного пути [34]. Кроме того, при высокой, свойственной молодым листьям скорости дыхания, вовлечение АП предотвращает перевосстановление пула убихинола – источника АФК в митохондриальной ЭТЦ [8].

Существенное повышение способности АП, о чем свидетельствует увеличение показателя V_{alt} , характеризующего скорость связанного с АП поглощения O_2 , отмечали у зрелых листьев *A. reptans* перед началом и в процессе перезимовки растений (табл. 2, рис. 2). Подавление основного цитохромоксидазного пути транспорта электронов на фоне повышения активности и вовлечения АП при действии пониженных температур отмечали и другие авторы [35]. Мы полагаем, что вовлечение АП осенью, когда низкие температуры тормозят процессы ассимиляции CO_2 , и во время перезимовки, связано с участием АП в совместном с антиоксидантной (табл. 1, рис. 1) и другими системами поддержании редокс-баланса клетки и сохранении ФСА при воздействии неблагоприятных условий среды. Ранее было отмечено повышение уровня дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла и увеличение тепловой диссипации энергии, накопление антоцианов [2].

Растения *A. reptans* не имеют специализированных органов запасаания ассимилятов. Продукты фотосинтеза (преимущественно сахара) накапливаются в листьях розетки осенью, а после перезимовки используются на формиро-

вание цветоносов, соцветий и новой генерации листьев. Накопление углеводов способствует повышению морозостойкости [36]. Превращение гексоз в пируват и/или оксалоацетат и их метаболизация в ЦТК может влиять на активность дыхательных ферментов, в том числе АОХ, модулируя взаимопревращения связей тиолдисульфид и взаимодействия серосодержащих аминокислот [37].

Хотя после схода снега перезимовавшие листья *A. reptans* испытывали действие суточных перепадов температуры и высокой инсоляции вследствие еще несформированного лесного полога, активность АП снижалась на фоне повышения активности ЦП. Это можно объяснить потребностью клеток в АТФ для восстановления структурно-функциональной организации ФСА. О возможности доставки АТФ специфическими транспортерами из митохондрий в хлоропласты для репарации ФСА и восстановления крупных пигмент-белковых комплексов фотосистем свидетельствуют данные, приводимые в работе [38]. Восстановление функций ФСА и возобновление ассимиляции CO_2 перезимовавших листьев, в свою очередь, увеличивает потребление энергии для экспорта ассимилятов в листья новой генерации. Как известно, до 50% дыхания зрелых листьев связано с обеспечением их донорной функции. В условиях высокого запроса на АТФ для транспорта ассимилятов из листа, высокая активность ЦП может поддерживать работу ФСА без вовлечения АОХ [11].

В стареющих листьях (июнь) отмечали значительное падение активности ЦП, тогда как способность V_{alt} практически не изменялась. В результате величина соотношения V_{cyt}/V_{alt} уменьшилась почти в 3 раза. Кроме того, увеличился вклад в дыхание остаточного поглощения O_2 (V_{res}). Остаточное дыхание связывают с окислением органических соединений различными оксидазами и оксидоредуктазами в пероксисомах и на эндоплазматическом ретикулуме [39]. Ранее такое явление наблюдалось нами у стареющих листьев *Rubus chamaemorus*, увеличение V_{res} коррелировало с повышением активности полифенолоксидаз и пероксидаз [40]. Высокая активность АП и интенсивное остаточное дыхание в стареющих листьях способствуют снижению концентрации O_2 и уменьшению образования АФК, что, по нашему мнению, позволяет поддерживать метаболизм и обеспечить более полную реутилизацию органических веществ и минеральных элементов из завершающих свой жизненный цикл листьев.

Роль АП, как компонента антиоксидантной системы, давно обсуждается в научной литературе. Показано, что изменение уровня экспрессии генов АОХ влияет на содержание АФК в клетках, активность и содержание транс-

криптов генов компонентов антиоксидантной системы, особенно, при действии стресса [7, 9]. Мы не обнаружили статистически значимых корреляций между содержанием H_2O_2 и TBARS, активностью антиоксидантных ферментов и дыхательных путей в онтогенезе листьев *A. reptans*. Анализ главных компонент показал, что исследуемые показатели можно сгруппировать относительно двух осей (компонент), которые описывают 73% дисперсии данных (рис. 3). В первую компоненту (PC1) основную нагрузку вносили содержание H_2O_2 и активности антиоксидантных ферментов. Видно, что динамика содержания H_2O_2 имеет сильную положительную взаимосвязь с активностью APX и данные показатели обратно взаимосвязаны с активностью CAT. Полученные результаты отражают разные механизмы участия данных ферментов (APX восстанавливает H_2O_2 , используя в качестве донора e^- аскорбат, а CAT разлагает H_2O_2 на воду и молекулярный кислород) в контроле содержания пероксида водорода в тканях листьев. Вокруг второй компоненты (PC2) были сгруппированы изменения активностей ЦП и АП (V_{cyt} , V_{alt}) и содержания продуктов липопероксидации (TBARS). Изменение активности АП было положительно взаимосвязано с ЦП. Между активностью АП и содержанием TBARS существовала обратная взаимосвязь: с увеличением активности АП содержание продуктов ПОЛ уменьшалось. Это может свидетельствовать об участии АП в контроле содержания АФК и уровня окислительного стресса. Результаты факторного анализа указывают на более сложное, чем линейное, но тесное взаимодействие ферментов антиоксидантной системы и АП в поддержании про-/антиоксидантного баланса в клетках листьев на разных этапах развития растений, особенно в условиях стресса. Вполне вероятно, что тесная взаимосвязь основного энергетически эффективного ЦП с энергодиссипирующим АП необходима для обеспечения соответствия энергетической эффективности использования дыхательного субстрата (ЭЭД) потребностям растения в энергии. Другими словами, ЭЭД, которую можно оценить по величине коэффициента $Y_{ATФ/глюкоза}$, падает при снижении потребления энергии. Согласно расчетам Amthor [12], выход АТФ при полном окислении 1 моля глюкозы ($Y_{ATФ/глюкоза}$) в дыхании по основному (цитохромному) пути составляет 29 молей (ранее считалось 36 молей), а при АП – 11 молей. Мы использовали эту информацию для оценки ЭЭД листьев. Расчеты показали, что величина $Y_{ATФ/глюкоза}$ с учетом вовлечения АП в дыхание листьев до перезимовки *A. reptans* составляла около 24, в период перезимовки снижалась на 15–20% и вновь возрастала после возобнове-

ния вегетации растений (рис. 4). Безусловно, важно учитывать, что общее поглощение O_2 измеряли при стандартной температуре 20°C, а применение ингибиторов позволяет оценить потенциальную способность дыхательных путей, которая может отличаться от реальной. Тем не менее, полученные величины отражают общие закономерности изменения ЭЭД в онтогенезе листьев, подвергнувшихся стрессовому воздействию условий среды во время перезимовки. Наблюдаемое снижение величины $Y_{ATФ/глюкоза}$ в период, связанный с перезимовкой (конец сентября–декабрь) и на завершающих этапах онтогенеза стареющих листьев, оказалось не столь значительным, как ожидалось, и, скорее всего, было обусловлено перестройкой метаболизма. Это согласуется с идеей о стремлении живой клетки к максимально возможной ЭЭД [6].

Таким образом, нами впервые на примере *A. reptans* выявлены закономерности онтогенетических и адаптивных изменений про-/антиоксидантного статуса и дыхания зимующих листьев травянистых растений. Получены данные

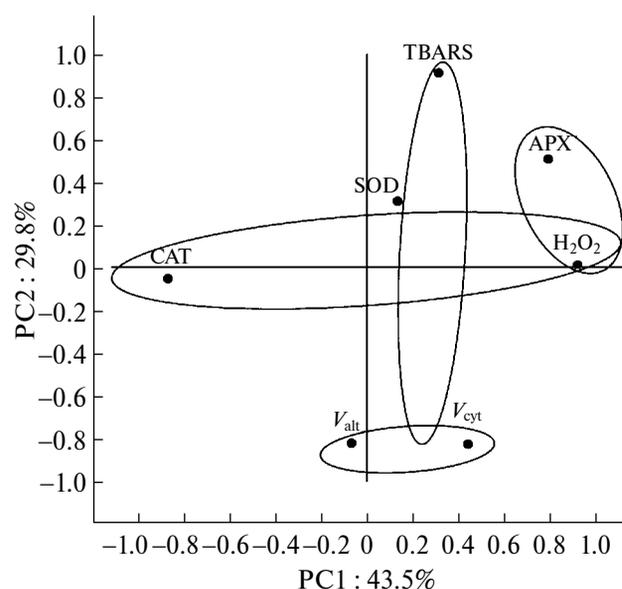


Рис. 3. Взаимосвязь показателей про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания в листьях *Ajuga reptans* в течение их жизненного цикла: TBARS – содержание продуктов перекисного окисления липидов; SOD, APX, CAT – активность супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы и каталазы соответственно; V_{cyt} и V_{alt} – способность цитохромного и альтернативного дыхательных путей. Сплошной линией объединены взаимосвязанные показатели, вносящие основную нагрузку в компоненту 1 (PC1) и/или компоненту 2 (PC2). Результаты получены с применением анализа главных компонент. Распределение показателей между двумя компонентами (осями) обосновано высокой долей суммарной дисперсии переменных (73.3%), которую они описывают.

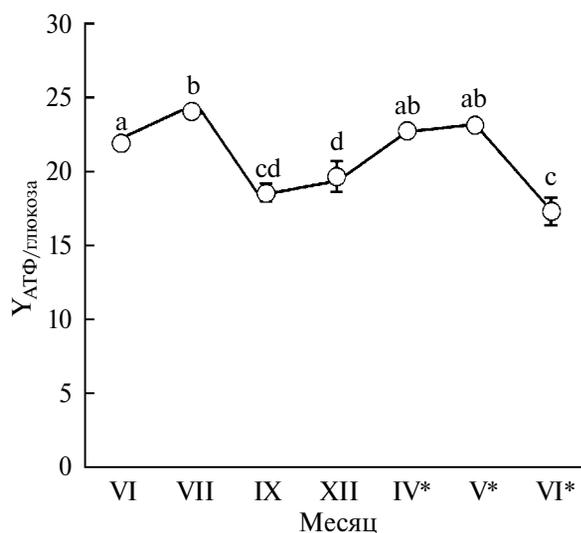


Рис. 4. Изменение энергетической эффективности дыхания (моль АТФ/моль глюкозы) листьев *Ajuga reptans* в течение их жизненного цикла. Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение года (ANOVA, критерий Дункана, $n = 5-10$, $P \leq 0.05$).

об участии антиоксидантных ферментов и их изоформ в поддержании приемлемого уровня липопероксидации и H_2O_2 в норме и при стрессе, связанном с перезимовкой. Результаты анализа главных компонент указывают на наличие тесных и нелинейных взаимосвязей между показателями про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания в онтогенезе зимующих листьев. Изменение соотношения дыхательных путей является неотъемлемым условием успешной перезимовки растений, вовлечение АП способствует торможению развития окислительного стресса, поддержанию редокс-баланса и соответствия уровня ЭЭД потребностям растения. Можно полагать, что связанное с перезимовкой незначительное снижение ЭЭД необходимо для поддержания гомеостаза при перестройке метаболизма. Повышение скорости энергетически эффективного ЦП после перезимовки имеет адаптивное значение для восстановления структурной целостности ФСА и возобновления функциональной активности листьев. В совокупности полученные данные о функционировании антиоксидантной системы и дыхания существенно дополняют и углубляют представления о защитных и адаптивных механизмах травянистых растений, зимующих с зелеными листьями.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКТР “Фотосинтез, дыхание и биоэнергетика растений и фототрофных организмов

(физиолого-биохимические, молекулярно-генетические и экологические аспекты)”, рег. № 122040600021-4.

Авторы благодарят д.б.н. О.В. Дымову за помощь в отборе образцов и полезные замечания.

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. Dymova O., Khristin M., Miszalski Z., Kornas A., Strzalka K., Golovko T. Seasonal variations of leaf chlorophyll–protein complexes in the wintergreen herbaceous plant *Ajuga reptans* L. // *Funct. Plant Biol.* 2018. V. 45. P. 519. <https://doi.org/10.1071/FP17199>
2. Dymova O.V., Zakhochiy I.G., Golovko T.K. Age and adaptive changes in the photosynthetic apparatus of leaves in winter green herbaceous plant *Ajuga reptans* L. in the natural conditions of the taiga zone // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70:114. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601325>
3. Mittler R., Zandalinas S.I., Fichman Y., Van Breusegem F. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. P. 663. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
4. Sachdev S., Ansari S.A., Ansari M.I., Fujita M., Hasanuzzaman M. Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms // *Antioxidants.* 2021. V. 10. P. 277. <https://doi.org/10.3390/antiox10020277>
5. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Fujita M., Fotopoulos V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator // *Antioxidants.* 2020. V. 9. P. 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
6. Golovko T.K., Garmash E.V. Plant respiration: classical and current notions // *Russ. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 108. <https://doi.org/10.1134/S1021443722060073>
7. Vishwakarma A., Tetali S., Selinski J., Scheibe R., Padmasree K. Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana* // *Ann. Bot.* 2015. V. 116. P. 555. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv122>
8. Van Aken O. Mitochondrial redox systems as central hubs in plant metabolism and signalling // *Plant Physiol.* 2021. V. 186. P. 36. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab101>

9. *Garmash E.V.* Suppression of mitochondrial alternative oxidase can result in upregulation of the ROS scavenging network: some possible mechanisms underlying the compensation effect // *Plant Biol.* 2022. V. 25. P. 43.
<https://doi.org/10.1111/plb.13477>
10. *Garmash E.V.* Mitochondrial respiration of the photosynthesizing cell // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 13.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060072>
11. *Vanlerberghe G.C., Dahal K., Alber N.A., Chadee A.* Photosynthesis, respiration and growth: a carbon and energy balancing act for alternative oxidase // *Mitochondrion.* 2020. V. 52. P. 197.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.04.001>
12. *Amthor J.S.* The McCree–de Wit–Penning de Vries–Thornley respiration paradigms: 30 years later // *Ann. Bot.* 2000. V. 86. P. 1.
<https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1175>
13. *McDonald A.E., Vanlerberghe G.C.* Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase // *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics.* 2006. V. 1. P. 357.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2006.08.001>
14. *Дымова О.В., Головки Т.К.* Морфофизиологические аспекты вегетативного размножения *Ajuga reptans* L. // Репродуктивная биология растений. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН. 1998. С. 72.
15. *Heath R.L., Packer L.* Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. V. 125. P. 189.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
16. *Vetoshkina D.V., Pozdnyakova-Filatova I.Yu., Zhurikova E.M., Frolova A.A., Naydov I.A., Ivanov B.N., Borisova-Mubarakshina M.M.* The increase in adaptive capacity to high illumination of barley plants colonized by rhizobacteria *P. putida* BS3701 // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. P.173.
<https://doi.org/10.1134/S0003683819020133>
17. *Malyshev R.V., Silina E.V.* Luminometer: principle of operation, device, and recommendations for assembly // *Instrum. Exp. Tech.* 2023. V. 66. P. 476.
18. *Beauchamp C., Fridovich I.* Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
19. *Nakano Y., Asada K.* Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* 1981. V. 22. P. 867.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
20. *Aebi H.* Catalase *in vitro* // *Methods Enzymol.* 1984. V. 105. P. 121.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
21. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
22. *Miszalski Z., Slesak I., Niewiadomska E., Baczek-Kwinta R., Lutge U., Ratajczak R.* Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C₃-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. // *Plant Cell Environ.* 1998. V. 21. P. 169.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00266.x>
23. *Mittler R., Zilinskas B.A.* Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium // *Anal. Biochem.* 1993. V. 212. P. 540.
<https://doi.org/10.1006/abio.1993.1366>
24. *Pezzoni M., Pizarro R.A., Costa C.S.* Detection of catalase activity by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in cell extracts from *Pseudomonas aeruginosa* // *Bio-protoc.* 2018. V. 8:e2869.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2869>
25. *Ding Y., Wang X.-T., Wang F., Shao Y.-L., Zhang A.-M., Chang W.* The effects of chilling stress on antioxidant enzymes activities and proline, malondialdehyde, soluble sugar contents in three *Paphiopedilum* species // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70. P. 61.
<https://doi.org/10.1134/S1021443722603184>
26. *Lee D.H., Lee C.B.* Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays // *Plant Sci.* 2000. V. 159. P. 75.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00326-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00326-5)
27. *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. P. 10375.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5>
28. *Santa-Cruz D.M., Pacienza N.A., Zilli C.G., Tomaro M.L., Balestrasse K.B., Yannarelli G.G.* Nitric oxide induces specific isoforms of antioxidant enzymes in soybean leaves subjected to enhanced ultraviolet-B radiation // *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 2014. V. 141. P. 202.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.019>
29. *Anjum N.A., Sharma P., Gill S.S., Hasanuzzaman M., Khan E.A., Kachhap K., Mohamed A.A., Thangavel P., Devi G.D., Vasudhevan P., Sofo A., Khan N.A., Misra A.N., Lukatkin A.S., Singh H.P. et al.* Catalase and ascorbate peroxidase – representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. P. 19002.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
30. *Головки Т.К.* Дыхание растений (физиологические аспекты). СПб: Наука, 1999. 204 с.
31. *Florez-Sarasa I.D., Bouma T.J., Medrano H., Azcon-Bieto J., Ribas-Carbo M.* Contribution of the cytochrome and alternative pathways to growth respiration and maintenance respiration in *Arabidopsis thaliana* // *Physiol. Plantarum.* 2007. V. 129. P. 143.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00796.x>
32. *Ivanova T.I., Kirpichnikova O.V., Sherstneva O.A., Yudin O.S.* Annual cycle of respiration in the leaves of

- evergreen plants // Russ. J. Plant Physiol. 1998. V. 45. P. 906.
33. Golovko T.K., Pystina N.V. The alternative respiration pathway in leaves of *Rhodiola rosea* and *Ajuga reptans*: presumable physiological role // Russ. J. Plant Physiol. 2001. V. 48. P. 733.
<https://doi.org/10.1023/A:1012596122292>
34. Millenaar F.F., Lambers H. The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function // Plant Biol. 2003. V. 5. P. 2.
<https://doi.org/10.1055/s-2003-37974>
35. Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Tauson E.L., Pobezhimova T.P., Katyshev A.I., Pavlovskaya N.S., Koroleva N.A., Lyubushkina I.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K., Bashmakov V.Yu., Popov V.N. Mitochondrial energy-dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. P. 506.
<https://doi.org/10.1134/S0006297914060030>
36. Seydel C., Kitashova A., Fürtauer L., Nägele T. Temperature-induced dynamics of plant carbohydrate metabolism // Physiol. Plant. 2022. V. 174. P. 13602.
<https://doi.org/10.1111/pp1.13602>
37. Plaxton W.C., Podestá F.E. The functional organization and control of plant respiration // Crit. Rev. Plant Sci. 2006. V. 25. P. 159.
<https://doi.org/10.1080/07352680600563876>
38. Li L., Nelson C.J., Trösch J., Castleden I., Huang S., Millar A.H. Protein degradation rate in *Arabidopsis thaliana* leaf growth and development // Plant Cell. 2017. V. 29. P. 207.
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00768>
39. Shugaeva N.A., Vyskrebentseva E.I., Orekhova S.O., Shugaev A.G. Effect of water deficit on respiration of conducting bundles in leaf petioles of sugar beet // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 329.
<https://doi.org/10.1134/S1021443707030065>
40. Shelyakin M.A., Zakhozhiy I.G., Golovko T.K. Ontogenetic aspects of plant respiration (by the example of *Rubus chamaemorus* L.) // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 92.
<https://doi.org/10.1134/S1021443716010167>

УДК 581.1.577.21:575.113.12

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ГЕНА МОНОДЕГИДРОАСКОРБАТРЕДУКТАЗЫ У КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.) И ЕГО РОЛЬ В ОТВЕТЕ НА СТРЕССЫ¹

© 2024 г. М. А. Филюшин^{a, *}, Д. Х. Архестова^{a, b}, Е. З. Кочиева^a, А. В. Щенникова^a

^aИнститут биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, Россия

^bИнститут сельского хозяйства, Федеральный научный центр “Кабардино-Балкарский научный центр
Российской академии наук”, Нальчик, Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 13.06.2023 г.

После доработки 15.06.2023 г.

Принята к публикации 15.06.2023 г.

Растения кукурузы *Zea mays* L. чувствительны ко многим стрессовым факторам, вызывающим избыточное образование активных форм кислорода, механизм нивелирования воздействия которых на организм включает фермент монодегидроаскорбатредуктазу (MDHAR; EC 1.6.5.4), катализирующий восстановление монодегидроаскорбиновой кислоты до аскорбата. В геноме кукурузы известно четыре гена *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4*, различающихся внутриклеточной локализацией кодируемых белков MDHAR. В данной работе был идентифицирован новый ген семейства – *ZmMDHAR5* (*Zm00001d017786*; LOC100193942), кодирующий близкий структурный гомолог пероксисомального *ZmMDHAR3*. Сделано предположение, что *ZmMDHAR5* может иметь функции, близкие к хлоропласт-митохондриальным MDHAR. Дифференциальная экспрессия генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR5* в проростках кукурузы в ответ на различные стрессовые факторы позволила также предположить важное участие *ZmMDHAR4* и *ZmMDHAR5* в ответе на экзогенную абсцизовую кислоту, низкие температуры и обезвоживание; *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR3* – на солевой стресс; *ZmMDHAR2* – на избыток соли и дефицит воды.

Ключевые слова: *Zea mays*, MDHAR, дифференциальная экспрессия гена в ответ на стрессовые факторы

DOI: 10.31857/S0015330324010067, EDN: NWCVVE

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм кислорода у аэробных организмов, в том числе у растений, приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), избыток которых индуцирует повреждение, нарушение функций и гибель клеток за счет окисления нуклеиновых кислот, липидов, белков и полисахаридов [1]. У растений способность нивелировать эффекты АФК считается одним из наиболее важных факторов, определяющих устойчивость к различным стрессам, и первая линия защиты представлена антиоксидантами. Механизмы устранения эффектов АФК включают ферменты (например, супероксиддисмутазы, пероксидазы, глутатион-S-трансферазы, аскорбатпероксидазы и пр.), а также неферментные компоненты, такие как алкалоиды, флавоноиды, каротиноиды и др. Важнейшим компонен-

том антиоксидантной системы растения считается L-аскорбиновая кислота (АК, витамин С), которая связывается с АФК (супероксидом кислорода, перекисью водорода и радикалом токоферола), восстанавливая их [2, 3]. Под действием аскорбатпероксидаз и аскорбатоксидаз образуется промежуточная окисленная форма АК – L-монодегидроаскорбиновая кислота (MDHA), которая затем может перейти в другую окисленную форму – L-дегидроаскорбиновую кислоту (DHA) [3]. Восстановление MDHA и DHA до аскорбата катализируется ферментами монодегидроаскорбатредуктазой (MDHAR; EC 1.6.5.4) и дегидроаскорбатредуктазой (DHAR; EC 1.8.5.1) соответственно [3].

Монодегидроаскорбатредуктазы различаются по локализации в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и цитозоле, и кодирующие их гены идентифицированы и описаны у многих видов растений [4–6]. Различные абиотические и биотические стрессы оказывают су-

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324010067

ществленное влияние на уровни транскрипции генов *MDHAR* и активность кодируемых ферментов [1, 4, 7–10]. Например, в ответ на солевой стресс у лука репчатого (*Allium cepa* L.) выявлено увеличение активности *MDHAR* в симпласте корня и листа [11]. В ответ на заражение грибным патогеном *Puccinia striiformis* в растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) растет экспрессия гена *TaMDHAR4* [7]. Сверхэкспрессия гена *MDHAR* томата (*Solanum lycopersicum* L.) и мангрового дерева (*Acanthus ebracteatus*) повышает устойчивость к солевому стрессу у табака (*Nicotiana*) [12] и риса (*Oryza sativa* L.) [13] соответственно.

В геноме кукурузы (*Zea mays* L.) идентифицированы гены основных ферментов путей биосинтеза и рециклинга АК, в том числе четыре гена, кодирующие монодегидроаскорбатредуктазы различной клеточной локализации: *ZmMDHAR1* (GRMZM2G084881), *ZmMDHAR2* (GRMZM2G134708), *ZmMDHAR3* (GRMZM2G320307) и *ZmMDHAR4* (GRMZM5G828229) [14–17]. Показано, что белки *MDHAR* и *DHAR* вовлечены в поддержание количества АК в эндосперме зерна кукурузы в процессе созревания [15]. Кроме того, после заражения зерна грибами *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans* и *Aspergillus flavus* наблюдается значительное снижение ферментной активности *MDHAR* [8].

В данной работе был идентифицирован новый ген монодегидроаскорбатредуктазы кукурузы – *Zm00001d017786* (LOC100193942), являющийся гомологом гена *ZmMDHAR3*. Данный ген, *ZmMDHAR5*, был охарактеризован в сравнении с известными членами семейства *ZmMDHAR*, в том числе по ответу на экзогенное воздействие абсцизовой кислоты (АБК) и абиотические стрессовые факторы (низкую положительную температуру, водный дефицит и избыток соли) в листьях проростков кукурузы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация и структурная характеристика генов *MDHARs*. Поиск последовательностей генов монодегидроаскорбатредуктаз проводили в геноме кукурузы *Z. mays* (сорт В73) (сборка GCF_902167145.1). В качестве референсных последовательностей использовали мРНК генов семейства *MDHAR Arabidopsis thaliana* L. *AtMDHAR1* (AT3G52880.1), *AtMDHAR2* (AT5G03630), *AtMDHAR3* (AT3G09940), *AtMDHAR4* (AT3G27820), *AtMDHAR6* (AT1G63940).

Выравнивание и структурно-филогенетический анализ нуклеотидных и белковых последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Для характеристики экзон-интронной структуры генов использовали данные NCBI ([\[nlm.nih.gov/gene/\]\(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/\)\). Консервативные домены и мотивы белков определяли с помощью программ NCBI-CDD \(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>\) и MEME 5.1.1 \(<http://meme-suite.org/tools/meme>\) в сопоставлении с литературными данными. Поиск трансмембранных спиралей, транспортных и сигнальных пептидов и доменов связывания с кофакторами проводили на серверах ТМНММ server 2.0 \(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/ТМНММ-2.0/>\), TargetP-2.0 \(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>\) и Cofactory-1.0 \(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Cofactory-1.0>\) соответственно. Молекулярный вес и изоэлектрическую точку \(pI\) белков рассчитывали с помощью ExPASy \(<https://web.expasy.org/protparam/>\), внутриклеточную локализацию предсказывали с помощью WoLF PSORT \(<https://wolfsort.hgc.jp/>\).](https://www.ncbi.</p></div><div data-bbox=)

Растительный материал, воздействие стрессовых факторов. В работе были использованы растения кукурузы сорта В73 (семена предоставлены Всероссийским институтом генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова). Растения выращивали в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м² с)) в течение 30 дней до стадии 3–4 листьев.

Полученные растения использовали для анализа реакции на стресс. Обработку холодом проводили при температуре 3°C в климатической камере (остальные условия выращивания прежние; контроль – необработанные растения). Воздействие АБК осуществляли опрыскиванием опытных растений водным 100 мкМ раствором АБК согласно [18, 19] (контроль – растения, опрысканные водой). Для анализа влияния водного дефицита и избытка соли опытные и контрольные растения извлекали из почвы, корни отмывали дистиллированной водой и переносили на жидкие МС-среды, содержащие (в случае опытных растений) 10% полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000; дефицит воды) или 250 мМ NaCl (избыток соли) соответственно.

Листья собирали через 6 и 24 ч после каждой обработки (контроль и опыт) и замораживали (–80°C) до дальнейшего анализа. Опыты проводили в двух биологических и трех технических повторах. Собранный растительный материал измельчали растиранием в жидком азоте и использовали для выделения суммарной РНК с последующей очисткой от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set; “QIAGEN”, Германия). На основе полученных препаратов РНК синтезировали кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System, “Promega”, США). Концентрации РНК и кДНК определяли количественно с помощью флуо-

риметрии (Qubit Fluorometer, “Thermo Fisher Scientific”, США).

Определение профиля экспрессии генов MDHAR. Профиль экспрессии генов семейства *MDHAR* определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого на основе идентифицированных кодирующих последовательностей генов *MDHAR* были разработаны специфичные праймеры (Дополнительные материалы, табл. 1). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов *MDHAR* оценивали, используя референсный ген *polyubiquitin* (GRMZM2G419891). Для ПЦР-РВ использовали 3 нг кДНК, набор “Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad Laboratories”, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин.; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Для визуализации данных и статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее в геноме кукурузы было идентифицировано четыре гена монодегидроаскорбатредуктаз, локализованные на хромосомах 2, 4, 5 и 10 [14]. В результате поиска в геноме кукурузы В73 (GCF_902167145.1) на хромосоме 5 был найден новый, не охарактеризованный ген семейства *MDHAR* – *Zm00001d017786* (LOC100193942), получивший название *ZmMDHAR5* (табл. 1). Ген *ZmMDHAR5* размером 2437 п.н. включает 7 экзонов, составляющих 1506 нуклеотидов кодирующей последовательности, что соответству-

ет белку длиной 501 а.о. Ближайшим гомологом *ZmMDHAR5* является белок *ZmMDHAR3* (идентичность последовательностей 66%), тогда как степень идентичности с остальными белками семейства *ZmMDHAR* составила 51% (*ZmMDHAR1*), 53% (*ZmMDHAR2*) и 43% (*ZmMDHAR4*).

Было обнаружено, что ген *ZmMDHAR5* локализован в непосредственной близости от гена *ZmMDHAR3*, и расстояние от последнего экзона *ZmMDHAR3* до первого экзона *ZmMDHAR5* составляет 849 п.н. (в геноме сорта В73). Структура фрагмента хромосомы 5, включающего оба гена и спейсер между ними, была проанализирована в геномах 35 генотипов кукурузы, включая 33 образца *Z. mays* ssp. *mays*, а также образцы дикой кукурузы (*Z. mays* ssp. *mexicana* и *Z. mays* ssp. *parviglumis*), доступные в NCBI. В результате, исходя из структуры анализируемого фрагмента, образцы были разделены на четыре группы (табл. 2, рис. 1). Вариант 1, куда вошел сорт В73, оказался наиболее часто встречающимся (15 образцов) и соответствовал наименьшей длине фрагмента и межгенного спейсера. Вариант 2, где фрагмент был почти в два раза длиннее варианта 1 за счет увеличения (в ~7.5 раз) интрона 1 гена *ZmMDHAR3*, был найден у двух образцов. Вариант 3 (10 образцов) превышал вариант 1 в ~3.5 раза в связи с удлинением межгенного спейсера (в ~19 раз). Вариант 4 (8 образцов) был еще протяженнее варианта 1 (в ~4 раза) вследствие увеличения последнего интрона *ZmMDHAR3* и межгенного спейсера (табл. 2, рис. 1).

Аминокислотная последовательность *ZmMDHAR5* содержала, как и остальные белки *ZmMDHAR*, каталитический домен Puf_redox_2 (pfam07992) (рис. 2), специфичный для семейства пиридиннуклеотиддисульфидокси-

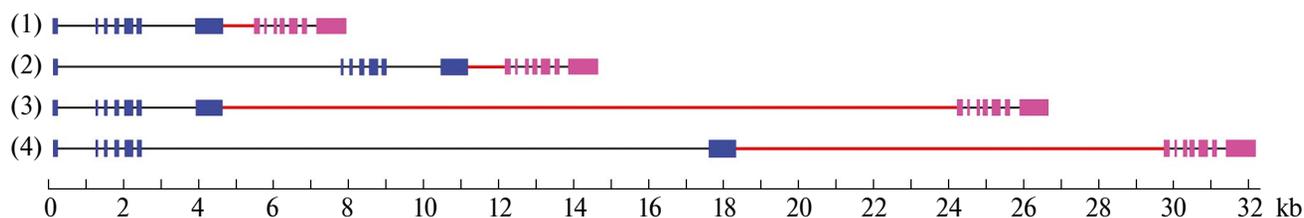
Таблица 1. Структурная характеристика семейства *ZmMDHAR* кукурузы (сорт В73)

Ген*	NCBI Gene ID	Локализация в геноме	Ген, п.н.	Количество экзонов	кДНК, нукл	Белок, а.о.	MW, kDa	pI
<i>ZmMDHAR1</i>	LOC100501585/ GRMZM2G084881	chr2: 170092027..170096426	4400	10	1308	435	46.7	5.45
<i>ZmMDHAR2</i>	LOC100382120/ GRMZM2G134708	chr4: 55570443..55574412	3970	9	1302	433	46.5	5.60
<i>ZmMDHAR3</i>	LOC100279805/ GRMZM2G320307	chr5: 209360354..209364879	4526	7	1437	478	51.9	8.54
<i>ZmMDHAR4</i>	LOC100272772/ GRMZM5G828229	chr10: 83203457..83207657	4201	17	1500	499	53.8	8.66
<i>ZmMDHAR5</i>	LOC100193942/ Zm00001d017786	chr5: 209357068..209359504	2437	7	1506	501	53.7	7.66

Примечание: * – названия генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4* даны в соответствии с [14].

Таблица 2. Размеры последовательностей генов *ZmMDHAR3*, *ZmMDHAR5* и спейсера между ними в геноме 35 образцов кукурузы из базы данных NCBI

	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
Образцы кукурузы (NCBI)	B73, PH207, B104, П14Н, F7, EP1, ОН7В, RP125, Мо18W, K0326Y, PHJ40, Мо17, B84, W22, ssp. <i>mexicana</i>	NC358, CIMBL55	CML247, KI3, ОН43, TZI8, DK105, PE0075, Ia453-sh2, A188, CML277, Zm00056a	CML333, Ky21, CML69, LH145, CML228, CML103, CML52, ssp. <i>parviglumis</i>
Фрагмент хромосомы <i>ZmMDHAR3</i> – <i>ZmMDHAR5</i> , п.н.	7772–8104	14511–14514	26552–26582	32072–32375
Ген <i>ZmMDHAR3</i> , п.н.	4473–4526	11067–11071	4527–4528	18208–18512
Межгенный спейсер, п.н.	849–1195	993	19589–19616	11419–11437
Ген <i>ZmMDHAR5</i> , п.н.	2351–2466	2450–2451	2436–2438	2430–2437

**Рис. 1.** Варианты (1–4) фрагмента *ZmMDHAR3*–*ZmMDHAR5* на хромосоме 5 в геноме 35 образцов кукурузы, включая экзон-интронную структуру генов *ZmMDHAR3* (экзоны обозначены синими блоками) и *ZmMDHAR5* (экзоны обозначены розовыми блоками); красной линией обозначен межгенный спейсер.

доредуктаз и включающий сайты связывания с кофакторами FAD/NAD(P)H [9]. Анализ последовательностей белков *ZmMDHAR* в программе Cofactory-1.0 идентифицировал по два сайта связывания с кофакторами FAD/NAD(P)H у каждого из пяти белков (рис. 2). При этом оба сайта содержали консенсус GxGxxG/GxGxxxG (рис. 2), характерный для FAD/NAD(P)H-связывающих доменов [20].

С целью определения внутриклеточной локализации белков *ZmMDHAR* был проведен анализ возможного присутствия в их последовательности трансмембранных α -спиралей, митохондриального и хлоропластного транспортных пептидов или мотивов, характерных для специфичной локализации монодегидроаскорбатредуктаз. В результате было предсказано, что *ZmMDHAR4* содержит на N-конце митохондриальный транспортный пептид (1–49 а.о.; вероятность 0.81), однако вероятность присутствия хлоропластного транспортного пептида очень низка (0.18). Белки *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* могут формировать две трансмембранные спирали в положениях 5-24/450-

472 а.о. и 5-24/467-489 а.о. соответственно. На C-конце *ZmMDHAR3* был обнаружен консервативный мотив WYGRKRRRW, характерный для пероксисомальных монодегидроаскорбатредуктаз [9]. Удлиненный вариант данного мотива (WYGWKAPYLAKRHF) присутствует также на C-конце *ZmMDHAR5*, однако не содержит при этом RK-обогащенного консенсуса (рис. 2). Ближайшие гомологи *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* – белки риса *OsMDHAR2* и *OsMDHAR1* соответственно, достоверно формируют только одну (C-терминальную) трансмембранную α -спираль и WYG-мотивы, сходные с мотивами своих ближайших гомологов.

На основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей MDHAR кукурузы, риса (*O. sativa*), спаржи (*Asparagus officinalis*), чеснока (*Allium sativum* L.) и модельного двудольного вида (*A. thaliana*) была построена дендрограмма (рис. 3). Согласно полученным данным, белки *ZmMDHAR* кластеризуются с соответствующими ортологами с четким разделением на клады (1), (2) и (3), которые объединяют цитозольные, пероксисомальные и

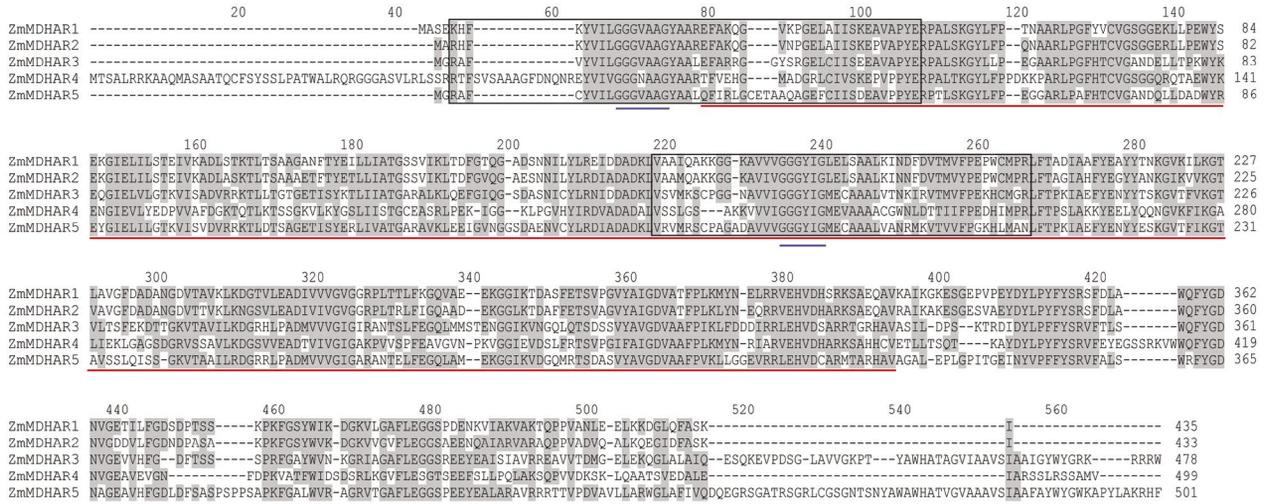


Рис. 2. Выравнивание последовательностей белков семейства ZmMDHAR. Домен Prg_redox_2 (pfam07992) подчеркнут красным. Черными рамками выделены сайты связывания с кофакторами FAD/NAD(P)H. Синим подчеркнут консенсус GxGxxG/GxGxxxG.

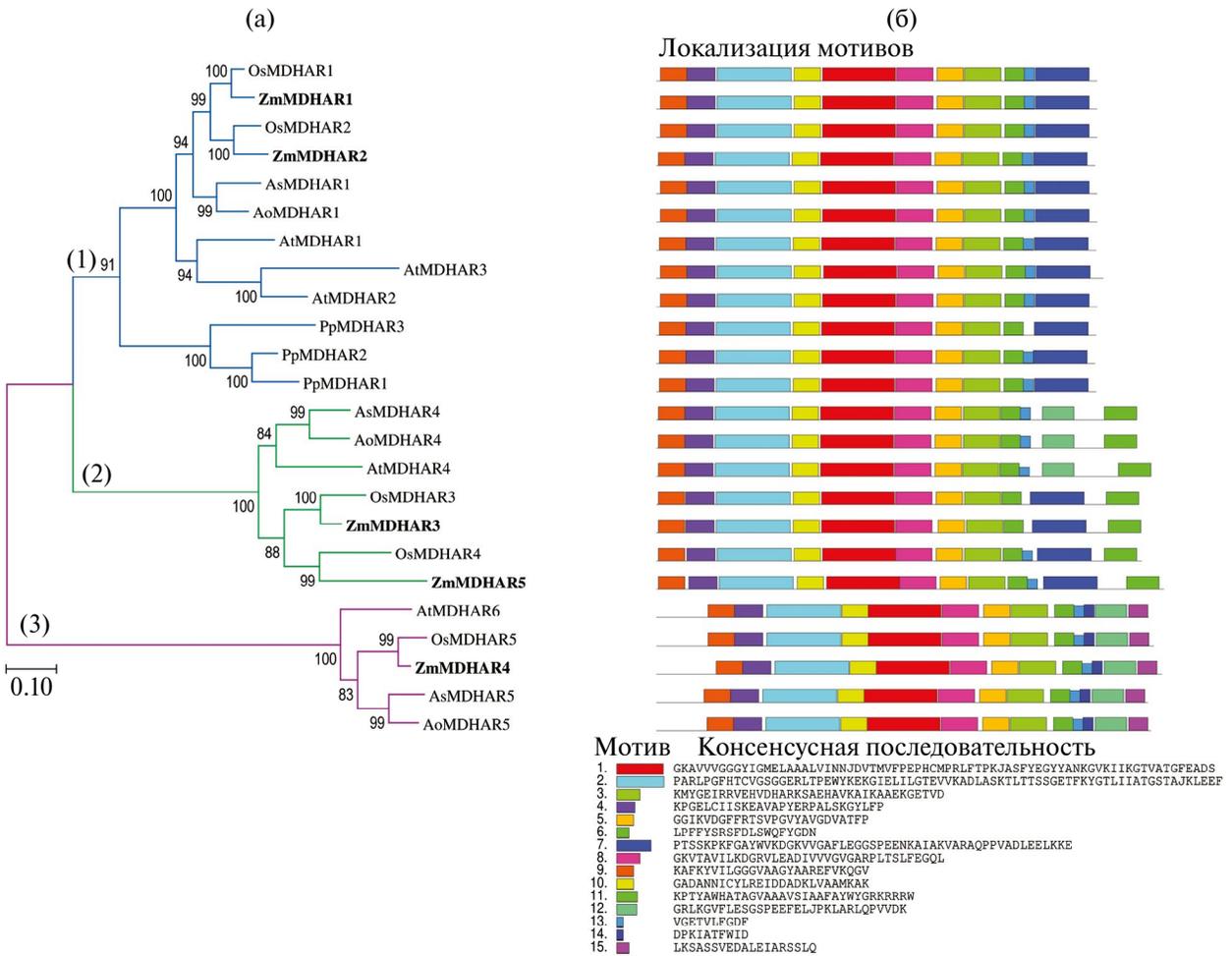


Рис. 3. а – Филогенетическое дерево на основе последовательностей белков MDHARs риса *O. sativa* (OsMDHAR1 (NP_001404045.1), OsMDHAR2 (NP_001403773.1), OsMDHAR3 (XP_015611766.1), OsMDHAR4 (NP_001390619.1), OsMDHAR5 (XP_015649952.1)), спаржи *As. officinalis* (AoMDHAR1 (XP_020260315.1), AoMDHAR4 (XP_020251572.1), AoMDHAR5 (XP_020241046.1)), чеснока *A. sativum* (AsMDHAR1 (Asa7G02482.1), AsMDHAR4 (Asa0G05211.1), AsMDHAR5 (Asa5G00445.1)), *A. thaliana* (AtMDHAR1 (At3g52880, NP_190856), AtMDHAR2 (At5g03630, NP_568125.1), AtMDHAR3 (At3g09940, NP_566361.1), AtMDHAR4 (At3g27820, NP_189420.1), AtMDHAR6 (At1g63940, NP_849839.1)) и *P. patens* (PpMDHAR1 (ABA47446.1), PpMDHAR2 (ABA47447.1) и PpMDHAR3 (ABA47448.1)). Дендрограмма построена с помощью программы MEGA 7.0 (метод Maximum Likelihood, 1000 бутстреп-реплик). б – Идентифицированные с помощью MEME 5.1.1 консервативные мотивы в белках MDHAR.

хлоропластные/митохондриальные MDHAR соответственно (рис. 3а). Белок ZmMDHAR5 ожидается вошел в кладу (2) вместе со своим ближайшим гомологом ZmMDHAR3 (рис. 3а).

Результаты анализа тех же аминокислотных последовательностей в программе MEME 5.1.1 подтвердили разделение белков MDHAR на дендрограмме. Всего было идентифицировано 15 консервативных мотивов, состав и расположение которых было специфичным в каждой из трех клад (рис. 3б). Десять мотивов (в порядке 9-4-2-10-1-8-5-3-6-13 от N- к C-концу) были общими (за редким исключением) для всех типов монодегидроаскорбатредуктаз. Мотив 7 специфично присутствовал у всех цитозольных белков клады (1), а также у пероксисомальных MDHAR клады (2), относящихся к образцам семейства Злаковые (рис. 3б). Белки другой части клады (2) и пластидные MDHAR клады (3) отличались от остальных наличием мотива 12 (рис. 3б). С-концевые мотивы 14 и 15 были обнаружены только у белков клады (3) (рис. 3б). Наконец, С-концевой мотив 11 оказался специфичным для пероксисомальных MDHAR клады (2) (рис. 3б) и включал в себя консенсус WYGRKRRRW/WYGWKAPYLAKRHF, специфичный для данного типа монодегидроаскорбатредуктаз [9].

С целью определить, участвуют ли гены *ZmMDHAR* в ответе на стрессы, нами было исследовано изменение уровней транскрипции данных генов в листьях проростков кукурузы при воздействии экзогенной АБК, а также в ответ на стрессы (холод, избыток соли и водный дефицит) (рис. 4). В результате было показано, что экспрессия гена *ZmMDHAR1* снижается в ответ на АБК, холод и обезвоживание, тогда как при избытке соли уровень транскриптов *ZmMDHAR1* сначала растет (в 1.7 раза через 6 ч воздействия), но затем (через 24 ч) падает почти до контрольного значения.

В сравнении с контролем, уровень транскриптов гена *ZmMDHAR2* возрастал в ответ на солевой стресс (в 3.2 раза через 6 ч и в 5.7 раз че-

рез 24 ч) и водный дефицит (в 1.8 и 3.9 раз через 6 и 24 ч соответственно) (рис. 4). При воздействии АБК экспрессия *ZmMDHAR2* сначала усиливалась в 1.1 раза (6 ч), а через 24 ч ослабевала в 2.4 раза (рис. 4).

Экспрессия гена *ZmMDHAR3* в ответ на АБК и водный дефицит последовательно (6–24 ч) снижалась, тогда как холодное воздействие привело сначала (6 ч) к падению уровня транскриптов в 2.1 раза, а затем (24 ч) – к его восстановлению до уровня контроля. В ответ на солевой стресс экспрессия *ZmMDHAR3* повышалась в 1.5 раза (6 ч), а через 24 ч снижалась в 1.5 раза по отношению к контролю (рис. 4).

Экспрессия гена *ZmMDHAR4* через 6 ч в ответ на АБК, избыток соли и обезвоживание поднималась в 1.4, 1.8 и 1.3 раза соответственно, а через 24 ч снижалась до уровня ниже контрольного. В ответ на холод количество мРНК *ZmMDHAR4* сначала уменьшалось (6 ч), а затем (24 ч) увеличивалось в 3 раза в сравнении с контролем (рис. 4).

Экспрессия гена *ZmMDHAR5* в ответ на АБК и холод снижалась в 1.2 раза через 6 ч и поднималась в 5.3 раза через 24 ч. При солевом стрессе происходило последовательное уменьшение уровня транскриптов гена (6–24 ч), тогда как в условиях водного дефицита наблюдался первоначальный (6 ч) рост уровня транскриптов в 2.4 раза с последующим (24 ч) его падением в 1.8 раза в сравнении с контролем (рис. 4).

Таким образом, все пять генов *ZmMDHAR* характеризовались индивидуальным экспрессионным ответом на стрессовые факторы, в том числе и гены, относящиеся к одной кладе. К примеру, *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR2* клады (1) сходным образом реагировали только на холод, тогда как ответ генов *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* клады (2) был строго ген-специфичным. Наибольший рост уровня транскриптов отмечался для *ZmMDHAR2* в ответ на соль и водный дефицит, *ZmMDHAR4* – в ответ на холод и *ZmMDHAR5* – в ответ на холод и обезвоживание.

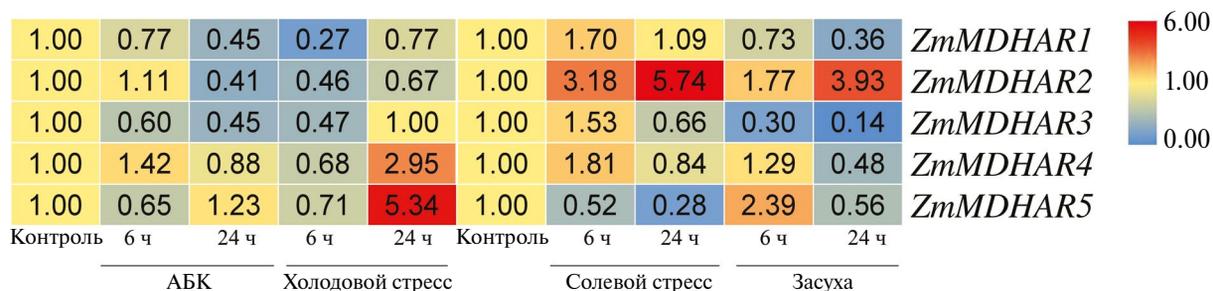


Рис. 4. Дифференциальная экспрессия генов *ZmMDHAR* в ответ на обработку АБК (100 мкМ), холодной стресс (+3°C), солевой стресс (NaCl, 250 мМ) и обезвоживание (10% ПЭГ-6000) в течение 6 и 24 ч. Необработанный контроль принят за 1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Кукуруза (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae) как одолетняя травянистая яровая злаковая культура с высокой экономической ценностью представляет собой результат доместикации дикорастущего предка (теосинте *Zea mays* ssp. *parviglumis*) в центральной долине реки Бальсас на юго-западе Мексики (субтропики) около 9000 лет назад [21]. Климат в центре происхождения способствовал высокой чувствительности кукурузы к основным стрессам, с которыми данная культура сталкивалась и продолжает сталкиваться при распространении по миру.

Современная кукуруза в значительной степени чувствительна к холоду [22], засухе [23], избытку соли [24] и грибным инфекциям [25], которые, провоцируя окислительный стресс, значительно снижают урожайность культуры. При этом изменяется экспрессия генов метаболизма аскорбата, в том числе генов *MDHAR*, и активность кодируемых ими ферментов, включая монодегидроаскорбатредуктазы. Так, избыток соли вызывает деструктивные изменения в хлоропластах кукурузы за счет светозависимого окислительного стресса, что сопровождается ростом ферментной активности *MDHAR* [24]. К водному дефициту кукуруза особенно восприимчива на стадии всходов, при этом ферментная активность *MDHAR* в условиях стресса снижается [23]. Повышенная чувствительность кукурузы к холоду наблюдается во время прорастания семян и фазы всходов, когда нарушается проницаемость клеточных мембран и происходит, в числе прочего, накопление высоких уровней АФК в растительных клетках [22]. Восприимчивость кукурузы к грибным патогенам продемонстрирована на примере инфекций *Fusarium* sp. [25]. Заражение растения грибами способствует накоплению в тканях микотоксинов, в ответ на которые изменяется ферментная активность *MDHAR* [8, 26, 27]. Важность для кукурузы восстановленных форм аскорбата как антиоксидантов подчеркивается тем, что даже при воздействии гербицида никосульфурона, используемого для борьбы с сорняками на кукурузных полях, растут уровни транскриптов *MDHAR* [28].

К настоящему времени в геноме кукурузы аннотировано четыре гена *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4*, кодирующие монодегидроаскорбатредуктазы [14, 16]. В данной работе нами был идентифицирован пятый ген семейства – *Zm00001d017786* (LOC100193942), локализованный на хромосоме 5 в тандемном кластере с известным геном *ZmMDHAR3*. Ген получил название *ZmMDHAR5* и был охарактеризован нами в сравнении с другими генами семейства (*ZmMDHAR1–ZmMDHAR4*).

Тандемное расположение генов *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5*, высокий уровень гомологии аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков (66%), а также совместная кластеризация на дендрограмме (рис. 3а) позволяет предполагать, что данные гены произошли в результате тандемной дупликации и *ZmMDHAR5* может выполнять сходные с *ZmMDHAR3* функции. О функции *ZmMDHAR3* известно немного. Уровень экспрессии гена повышается в ответ на атаку двух видов тли (*Rhopalosiphum padi* L., *Sitobion avenae* F.) [16], что допускает участие *ZmMDHAR5* в реакции на биотические стрессовые факторы.

Среди ближайших гомологов *ZmMDHAR5* также отмечены два гена *O. sativa* – *OsMDHAR1* и *OsMDHAR2* (рис. 3а), последний из которых детально охарактеризован в работе [19] под названием *OsMDHAR4* (далее по тексту *OsMDHAR2*). Транскрипты гена *OsMDHAR2* присутствуют во всех органах (с максимумом в листе), и их уровень изменяется в разной степени в ответ на воздействие экстремальных температур, засухи, избытка соли, H₂O₂ и АБК [19]. Мутация *osmdhar2* способствует закрытию устьиц, накоплению перекиси водорода и повышению устойчивости растений риса к тепловому стрессу; сверхэкспрессия *OsMDHAR2* ожидаемо оказывает противоположный эффект [19].

Клада (2), куда входит кластер белков *ZmMDHAR3*, *ZmMDHAR5*, *OsMDHAR1* и *OsMDHAR2* (рис. 3а), объединяет пероксисомальные ферменты, если исходить из известной локализации кладообразующего *MDHAR4 A. thaliana* [29]. Однако белок *OsMDHAR2* локализуется в хлоропластах, согласно результатам анализа локализации *OsMDHAR2*, сшитого с последовательностью желтого флуоресцентного белка (YFP), при транзientной экспрессии в эпидермальных клетках *Nicotiana benthamiana* L. [19].

Подтверждением пероксисомальной локализации *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* может служить формирование ими двух трансмембранных α -спиралей, характерных для пероксисомальных *MDHAR*. Интересно, что их гомологи *OsMDHAR1* и *OsMDHAR2* с высокой достоверностью формируют только С-терминальную α -спираль, в то время как образование второй, N-терминальной α -спирали имеет низкую достоверность. Другой отличительный признак пероксисомальных *MDHAR*, консенсус R(K/R)RRR [29], присутствует на С-конце последовательностей *ZmMDHAR3* и *OsMDHAR2*, однако отсутствует у *ZmMDHAR5* и *OsMDHAR1*. Поэтому, несмотря на значимость RK-богатых последовательностей для экспорта белка в клеточные компартменты [30,31], связь консенсуса R(K/R)RRR с транспортом *MDHAR* в пероксисомы яв-

ляется спорной. Показанная хлоропластная локализация OsMDHAR2 [19] сочетается с отсутствием у него хлоропластного транспортного пептида, которого нет и у остальных трех белков.

Исходя из вышесказанного, в том числе противоречивых структурных и литературных данных, можно предположить, что ген *ZmMDHAR5* экспрессируется во всех органах растения с максимумом в листе; продукт гена – фермент *ZmMDHAR5*, участвует в ответах на стрессовые факторы, как биотические, так и абиотические, при этом его локализация внутри клетки требует дополнительных исследований.

Считается, что самое древнее происхождение среди белков семейства MDHAR имеют цитозольные ферменты (клада (1) на рис. 3а), так как все *PpMDHAR* мха *Physcomitrella patens* гомологичны (включая экзон-интронную структуру генов *PpMDHAR*) цитозольным MDHAR высших растений и лишены N-/C-концевых сигналов локализации белков MDHAR в оргanelлах [32]. Участие генов *PpMDHAR* в стрессовых ответах предполагает связь адаптационной эволюции наземных растений с эволюцией цитозольных MDHAR, которые стали предшественниками мембран-связываемых пероксисомальных и затем хлоропласт-митохондриальных MDHAR [32]. Таким образом, гены *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5* могут иметь недавнее происхождение относительно *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR2*, и предшествовать появлению *ZmMDHAR4*.

Структурные особенности белка *ZmMDHAR5*, вхождение в кладу (2) (рис. 3а) и гомология с OsMDHAR2 позволяют допустить как пероксисомальную, так и хлоропластную локализацию *ZmMDHAR5* как возможной переходной формы между пероксисомальными и хлоропласт-митохондриальными MDHAR кукурузы. Подобный статус, к примеру, имеет белок *A. thaliana* AtMDHAR1, входящий в кладу (1) цитозольных MDHAR (рис. 3а), однако по локализации относящийся скорее к пероксисомальным белкам [29] и являющийся возможной переходной формой между цитозольными и пероксисомальными MDHAR.

Учитывая изменения ферментной активности MDHAR в ответ на абиотические и биотические стрессы у кукурузы [16, 23, 24, 26, 28], а также дифференциальную экспрессию генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4* в ответ на атаку тли [16], все гены *ZmMDHAR*, включая *ZmMDHAR5*, могут участвовать в стрессовом ответе. С целью проверки данного предположения был проведен анализ уровней транскриптов генов *ZmMDHAR1–5* в листьях проростков кукурузы при опрыскивании водным раствором АБК, а также в ответ на абиотические стрессовые факторы (холод, избыток соли и водный дефицит). АБК была использована нами, поскольку данный фитогормон не

только играет одну из доминирующих ролей в ответе на абиотические стрессы [22], но и участвует в ответе на биотические стрессы, оказывая разнонаправленное влияние на защитные реакции растения в зависимости от его взаимодействия с патогенами [33].

Показанный в результате индивидуальный для каждого из пяти генов *ZmMDHAR* ответ на стрессовые факторы (рис. 4), вероятно, связан со специфичностью/локализацией *ZmMDHAR1–ZmMDHAR5* в сочетании с особенностями воздействия конкретного стресса на растительную клетку. Несмотря на структурную гомологию и, возможно, общее происхождение генов *ZmMDHAR3* и *ZmMDHAR5*, их ответ на все четыре вида воздействия значительно различался (рис. 4), что может служить косвенной поддержкой предположения о переходном статусе *ZmMDHAR5*. В пользу этого говорит также сходство профиля изменения экспрессии гена *ZmMDHAR5* с профилем гена *ZmMDHAR4* (хлоропласт-митохондриальная клада, рис. 4) в условиях низкой температуры и водного дефицита, деструктивно влияющих на хлоропласты [22, 23].

Уникальность роли *ZmMDHAR5* в нивелировании последствий как абиотических, так и биотических стрессов у кукурузы подчеркивается увеличением уровня его транскриптов через 24 ч после обработки АБК, в то время как экспрессия остальных *ZmMDHAR* резко снижалась (рис. 4). Более того, значительный (в 5.3 раза) рост экспрессии *ZmMDHAR5* спустя сутки пребывания растения на холоде (рис. 4) говорит о важной роли гена в определении устойчивости кукурузы к низким температурам. Ранний (6 ч) высокий ответ *ZmMDHAR5* на обработку ПЭГ (рис. 4) указывает на участие гена в регуляции устойчивости растения к нехватке воды на начальных этапах засушливого периода. Дифференциальная экспрессия генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4* в ответ на стрессы предполагает важность активации *ZmMDHAR4* в условиях низкой температуры и избытка соли, а также *ZmMDHAR2* при избытке соли и нехватке воды.

В целом, только при воздействии низкой температуры экспрессия всех пяти генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR5* изменялась сходным образом – снижалась при раннем ответе и поднималась спустя сутки воздействия. Резкое снижение экспрессии относящихся к цитозольной группе генов *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR2*, отмеченное при раннем (6 ч) ответе на холод (рис. 4), согласуется с подобной реакцией гомологичного им гена риса *OsMDHAR3* (в статье ген назван *OsMDHAR1*) при витрификации побегов [34].

При влиянии других трех факторов наблюдалась значительная изменчивость реакции генов, в том числе во времени (рис. 4). Это может быть связано с типом воздействия фактора в случае каждого конкретного клеточного компартмен-

та и, как следствие, с локализацией и функциональными особенностями рассматриваемых ферментов.

С учетом функции MDHAR, заключающейся в восстановлении MDHA до аскорбата [3], можно предположить, что ответное действие генов *ZmMDHAR* направлено на поддержание концентрации аскорбата как антиоксиданта на уровне, необходимом для устранения воздействия растущих при стрессе количеств АФК. При этом следует отметить, что аскорбат не является единственным и главным антиоксидантом. К примеру, при обезвоживании его количество в различных компартментах клетки поддерживается на постоянном уровне до очень поздних стадий засухи [35]. В то же время падает содержание другого важного антиоксиданта – глутатиона [35].

Более того, разные компартменты клетки могут быть по-разному вовлечены в поддержание аскорбата на нужном уровне. К примеру, витамин С в растении синтезируется в цитозоле, за исключением конечной стадии синтеза, которая осуществляется в межмембранном пространстве митохондрий, после чего аскорбат может транслоцироваться в цитозоль и хлоропласты [36].

Также необходимо учитывать, что MDHAR – это только один из группы ферментов синтеза-рециклинга аскорбата в растении [36]. Поэтому значительная изменчивость реакции генов *ZmMDHAR* на изучаемые факторы может свидетельствовать о различиях в степени их привлечения в совместную с другими ферментами деятельность по поддержанию нужного клетке количества аскорбата как в нормальных условиях, так и при стрессовых воздействиях.

Таким образом, в данной работе был идентифицирован новый ген семейства MDHAR – *ZmMDHAR5*, который кодирует гомолог пероксисомального фермента *ZmMDHAR3*, однако может иметь функции, близкие к хлоропласт-митохондриальным белкам MDHAR. Дифференциальная экспрессия генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR5* в проростках кукурузы при различных стрессах предполагает важное участие *ZmMDHAR5* и *ZmMDHAR4* в ответе на АБК, холод и водный дефицит; *ZmMDHAR1* и *ZmMDHAR3* – в раннем ответе на солевой стресс; *ZmMDHAR2* – в устойчивости кукурузы к избытку соли и нехватке воды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 21-16-00008; Идентификация и характеристика нового гена *ZmMDHAR5*) и Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства Российской Федерации (“Аграрная наука – шаг в будущее развитие АПК”; характеристика стрессового ответа генов *ZmMDHAR1–ZmMDHAR4*).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных и людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and anti-oxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. P. 909. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
2. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. P. 405.
3. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 22. P. 116. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
4. Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Río L.A. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase, genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 2111. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066225>
5. Sano S., Tao S., Endo Y., Inaba T., Hossain M.A., Miyake C., Matsuo M., Aoki H., Asada K., Saito K. Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005. V. 69. P. 762.
6. Zhou F., Zheng B., Wang F., Cao A., Xie S., Chen X., Schick J.A., Jin X., Li H. Genome-Wide Analysis of MDHAR gene family in four cotton species provides insights into fiber development via regulating AsA redox homeostasis // *Plants.* 2021. V. 10. Article 227. <https://doi.org/10.3390/plants10020227>
7. Feng H., Liu W., Zhang Q., Wang X., Wang X., Duan X., Li F., Huang L., Kang Z. TaMDHAR4, a monodehydroascorbate reductase gene participates in the interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. tritici // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 76. P. 7. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.015>
8. Lanubile A., Maschietto V., De Leonardis S., Battilani P., Paciolla C., Marocco A. Defense responses to mycotoxin-producing fungi *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, and *Aspergillus flavus* in kernels of susceptible and resistant maize genotypes // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015. V. 28. P. 546. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0269-R>
9. Negi B., Salvi P., Bhatt D., Majee M., Arora S. Molecular cloning, in-silico characterization and functional validation of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana* // *PLoS ONE.* 2017. V. 12. Article e0187793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187793>
10. Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang X., Ma X., Huang L., Yan Y. Clones of *FeSOD*, *MDHAR*, *DHAR* Genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes

- during abiotic stress and hormone treatments // *Molecules*. 2015. V. 20. P. 20939.
<https://doi.org/10.3390/molecules201119741>
11. *García G., Clemente-Moreno M.J., Díaz-Vivancos P., García M., Hernández J.A.* The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: response to long-term salt stress // *Antioxidants*. 2020. V. 12. Article 67.
<https://doi.org/10.3390/antiox9010067>
 12. *Qi Q., Yanyan D., Yuanlin L., Kunzhi L., Huini X., Xudong S.* Overexpression of *SIMDHAR* in transgenic tobacco increased salt stress tolerance involving S-nitrosylation regulation // *Plant Sci*. 2020. V. 299. Article 110609.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110609>
 13. *Sultana S., Khew C.Y., Morshed M.M., Namasivayam P., Napis S., Ho C.L.* Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (*AeMDHAR*) confers salt tolerance on rice // *J. Plant Physiol*. 2012. V. 169. P. 311.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.09.004>
 14. *Liu Y.J., Yuan Y., Liu Y.Y., Liu Y., Fu J.J., Zheng J., Wang G.Y.* Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses // *J. Plant Physiol*. 2012. V. 169. P. 183.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.08.018>
 15. *Sanahuja G., Farré G., Bassie L., Zhu C., Christou P., Capell T.* Ascorbic acid synthesis and metabolism in maize are subject to complex and genotype-dependent feedback regulation during endosperm development // *Biotechnol. J*. 2013. V. 8. P. 1221.
<https://doi.org/10.1002/biot.201300064>
 16. *Sytykiewicz H.* Expression patterns of genes involved in ascorbate-glutathione cycle in aphid-infested maize (*Zea mays* L.) seedlings // *Int. J. Mol. Sci*. 2016. V. 17. Article 268.
<https://doi.org/10.3390/ijms17030268>
 17. *Hu X., Liu J., Li W., Wen T., Li T., Guo X., Liu R.H.* Biosynthesis and accumulation of multi-vitamins in black sweet corn (*Zea mays* L.) during kernel development // *J. Sci. Food Agric*. 2020. V. 100. P. 5230.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10573>
 18. *Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V.* *Zm-DREB2.9* gene in maize (*Zea mays* L.): genome-wide identification, characterization, expression, and stress response // *Plants*. 2022. V. 11. P.3060.
<https://doi.org/10.3390/plants11223060>
 19. *Liu J., Sun X., Xu F., Zhang Y., Zhang Q., Miao R., Zhang J., Liang J., Xu W.* Suppression of *OsMDHAR4* enhances heat tolerance by mediating H₂O₂-induced stomatal closure in rice plants // *Rice*. 2018. V. 11. Article 38.
<https://doi.org/10.1186/s12284-018-0230-5>
 20. *Yoon H.S., Lee H., Lee I.A., Kim K.Y., Jo J.* Molecular cloning of the monodehydroascorbate reductase gene from *Brassica campestris* and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1658. P. 181.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.05.013>
 21. *Chen Q., Li W., Tan L., Tian F.* Harnessing knowledge from maize and rice domestication for new crop breeding // *Mol. Plant*. 2021. V. 14. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.12.006>
 22. *Zhou X., Muhammad I., Lan H., Xia C.* Recent advances in the analysis of cold tolerance in maize // *Front Plant Sci*. 2022. V. 13. Article 866034.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.866034>
 23. *Xie T., Gu W., Zhang L., Li L., Qu D., Li C., Meng Y., Li J., Wei S., Li W.* Modulating the antioxidant system by exogenous 2-(3,4-dichlorophenoxy) triethylamine in maize seedlings exposed to polyethylene glycol-simulated drought stress // *PLoS One*. 2018. V. 13. Article e0203626.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203626>
 24. *Omoto E., Nagao H., Taniguchi M., Miyake H.* Localization of reactive oxygen species and change of antioxidant capacities in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize under salinity // *Physiol. Plant*. 2013. V. 149. P. 1.
<https://doi.org/10.1111/pp1.12017>
 25. *Bryła M., Pierzgański A., Zapaśnik A., Uwineza P.A., Ksieniewicz-Woźniak E., Modrzewska M., Waśkiewicz A.* Recent research on *Fusarium* mycotoxins in maize—a review // *Foods*. 2022. V. 11. Article 3465.
<https://doi.org/10.3390/foods11213465>
 26. *Ismaiel A.A., Papenbrock J.* Effect of patulin from *Penicillium vulpinum* on the activity of glutathione-S-transferase and selected antioxidative enzymes in maize // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2017. V. 14. Article 825.
<https://doi.org/10.3390/ijerph14070825>
 27. *Shabeer S., Asad S., Jamal A., Ali A.* Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review // *Toxins*. 2022. V. 14. Article 307.
<https://doi.org/10.3390/toxins14050307>
 28. *Wang J., Zhong X., Zhu K., Lv J., Lv X., Li F., Shi Z.* Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activity, and gene expression patterns in a pair of nearly isogenic lines of nicosulfuron-exposed waxy maize (*Zea mays* L.) // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 2018. V. 25. P. 19012.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2105-0>
 29. *Lisenbee C.S., Lingard M.J., Trelease R.N.* Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase // *Plant J*. 2005. V. 43. P. 900.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02503.x>
 30. *Hu B., Zeng W.P., Li X., Al-Sheikh U., Chen S.Y., Ding J.* A conserved arginine/lysine-based motif promotes ER export of KCNE1 and KCNE2 to regulate KCNQ1 channel activity // *Channels*. 2019. V. 13. P. 483.
<https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1685626>
 31. *Kano T., Kouzuki T., Mizuno S., Ueda S., Yamano M., Sakane F., Saito N., Shirai Y.* Both the C1 domain and a basic amino acid cluster at the C-terminus are important for the neurite and branch induction ability of DGKβ // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014. V. 447. P. 89.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.113>

32. Lunde C., Baumann U., Shirley N.J., Drew D.P., Fincher G.B. Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (*Mdhar*) genes in *Physcomitrella patens*: implications for the evolution of the MDHAR family in plants // *Plant Mol. Biol.* 2006. V. 60. P. 259. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-3881-8>
33. De Vleeschauwer D., Xu J., Höfte M. Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. Article 611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00611>
34. Huang B., Zhang J.M., Chen X.L., Xin X., Yin G.K., He J.J., Lu X.X., Zhou Y.C. Oxidative damage and antioxidant indicators in 48 h germinated rice embryos during the vitrification-cryopreservation procedure // *Plant Cell Rep.* 2018. V. 37. P. 1325. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2315-4>
35. Koffler B.E., Luschin-Ebengreuth N., Stabentheiner E., Müller M., Zechmann B. Compartment specific response of antioxidants to drought stress in *Arabidopsis* // *Plant Sci.* 2014. V. 227. P. 133. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.08.002>
36. Fenech M., Amaya I., Valpuesta V., Botella M.A. Vitamin C content in fruits: biosynthesis and regulation // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 9. Article 2006. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.02006>

УДК 581.1

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПОЛУАЛЬДЕГИДА ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ В ЛИСТЯХ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.) ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ¹

© 2024 г. Д. Н. Федорин^а, А. С. Бородин^а, А. Т. Епринцев^а. *

^аФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Воронежский государственный университет”, Воронеж, Россия
*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 04.01.2024 г.

Принята к публикации 09.01.2024 г.

Установлено повышение активности фермента в листьях мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при солевом стрессе, что связано с поддержанием скорости функционирования цикла трикарбоновых кислот за счет притока дополнительных субстратов. Увеличение активности дегидрогеназы полуальдегида янтарной кислоты (ПЯКДГ) в листьях пшеницы при солевом стрессе, вызванном хлоридом натрия (NaCl), достигает максимального значения на 6 ч и составляет 12.2 Е/г сырой массы. Активация исследуемого фермента обеспечивает поддержание необходимого уровня АТФ за счет дополнительного поступления дыхательного субстрата в ЦТК при действии стрессового фактора. Установлена генетическая детерминация ПЯКДГ. На основании мРНК гомеологичных генов *SSADH* разработаны специфические праймеры для оценки уровня их транскриптов. Показано изменение содержания транскриптов генов фермента ПЯКДГ в листьях пшеницы при действии солевого стресса. Сравнительный анализ изменения активности ПЯКДГ и экспрессии исследуемых генов в листьях пшеницы в условиях солевого стресса свидетельствует о регуляции данного энзима за счет изменения их транскрипционной активности. Базовый вклад в изменение содержания транскриптов ПЯКДГ вносит ген *SSADH* А-субгена. Выявлено наличие специфического сайта связывания солевого стресса транскрипционного фактора WRKY в составе промотора гена *SSADHA*. Увеличение содержания транскриптов WRKY может обеспечивать регуляцию экспрессии гена *SSADHA* при адаптации растений к стрессовому воздействию при взаимодействии со специфическим сайтом связывания, расположенном в области инициации транскрипции его промотора.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, дегидрогеназа полуальдегида янтарной кислоты, солевой стресс, транскрипционный фактор, экспрессия

DOI: 10.31857/S0015330324010088, EDN: NVTDMР

ВВЕДЕНИЕ

Засоление почв представляет собой один из самых распространенных факторов, влияющих на продуктивность сельскохозяйственных культур, в том числе важнейшей зерновой культуры, которой является пшеница (*Triticum aestivum* L.) [1]. Воздействие засоления пагубно влияет на пшеницу, понижая урожайность и выживаемость растения.

Геном пшеницы состоит из 42 хромосом, разделенных на 3 близкородственных субгена (AA, BB, DD). Гены и хромосомы, принадлежащие разным видам, и объединенные благодаря

аллополиплоидизации в одном геноме, называются гомеологичными [2]. Гомеологи имеют высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей, что затрудняет оценку вклада генов из каждого субгена в общий уровень экспрессии [3].

Повышенная концентрация солей в почвенном растворе приводит к двум основным воздействиям на растение. Во-первых, снижается способность растения поглощать воду. Во-вторых, накопление Na⁺ и Cl⁻ до высоких уровней приводит к токсическому воздействию на клетки [4]. Солевой стресс вызывает активацию многочисленных мессенджерных систем, такие как волны повышения концентрации Ca²⁺, сигнальные пути активных форм кислорода, каскад фос-

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324010088

форилирования/дефосфорилирования белков, гормональные ответы и др. [5]. В конечном итоге происходят изменения в метаболизме растения, связанные с индукцией или репрессией большого количества белков, участвующих в адаптивных реакциях. Эти процессы затрагивают, в том числе, ферменты цикла трикарбонных кислот (ЦТК), компоненты электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) растений и альтернативные и шунтирующие метаболические пути, такие как шунт γ -аминомасляной кислоты [6]. Роли шунта γ -аминомасляной кислоты в адаптации растений к стрессовым условиям уделяется большое внимание в настоящее время [7, 8].

Дегидрогеназа полуальдегида янтарной кислоты (ПЯКДГ, КФ 1.2.1.16) является ферментом шунта γ -аминомасляной кислоты, катализирующим превращение янтарного полуальдегида в янтарную кислоту, с образованием НАД \cdot H. Данный этап шунта обеспечивает не только обходной путь ЦТК, но и его координацию и трансформацию ЭТЦ, в связи с образованием субстрата для второго комплекса цепи – дегидрогеназы янтарной кислоты [9].

Согласно опубликованным данным, большое количество генов мягкой пшеницы являются дифференциально экспрессируемыми при солевом стрессе [10]. Изменения экспрессии направлены на противодействие влиянию засоления. Особую роль в данном случае играют факторы транскрипции, которые непосредственно активируют или подавляют транскрипцию генов в ответ на солевое воздействие. Одним из крупнейших семейств транскрипционных факторов растений является WRKY. Известно, что белки WRKY участвуют в адаптации растений к солевому стрессу [11].

В связи с этим, целью работы является исследование влияния солевого стресса на функционирование дегидрогеназы полуальдегида янтарной кислоты в листьях пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были 14-дневные проростки мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенные гидропонным методом при 14-часовом световом дне с интенсивностью света 90 мкмоль квантов/(м² с), при температуре окружающей среды 25°C.

Солевой стресс инициировался помещением проростка пшеницы, с предварительно удаленной корневой системой, в 150 мМ водный раствор хлорида натрия. Удаление корней осуществляли для изучения непосредственного влияния Na⁺ и Cl⁻ на регуляцию метаболических процессов в листьях пшеницы, поскольку корневая система служит селективным барьером для радиального транспорта ионов до того,

как они попадут в стелу и далее в ткани листьев. Концентрации было достаточно, чтобы вызвать изменения в обмене веществ без серьезного повреждения растений [12]. Инкубация в солевом растворе опытной группы прерывалась спустя 1, 3, 6, 12 и 24 ч после начала эксперимента. В контрольной группе были растения, помещенные на 24 ч в воду.

Активность ПЯКДГ измерялась спектрофотометрически, основываясь на увеличении оптической плотности в кювете при $\lambda = 340$ нм, связанном с образованием НАДН [13]. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль янтарного полуальдегида за 1 мин при 25°C.

Для оценки экспрессии генов ПЯКДГ пшеницы были сконструированы праймеры (табл. 1, Дополнительные материалы), для каждого из гомеологичных генов (*SSADHA* – LOC123132549, *SSADHB* – LOC123136622, *SSADHD* – LOC123144134) [14]. Нуклеотидные последовательности мРНК генов ПЯКДГ *Triticum aestivum* были взяты из международной базы данных NCBI.

Подбор праймеров для гена *WRKY3* (LOC100192142) осуществлялся с использованием программы Primer-BLAST на основе нуклеотидных последовательностей из международной базы данных NCBI. Олигонуклеотидные последовательности праймеров: прямой 5'-GTCCCCTGTTTTTCAGGTTCA-3', обратный 5'-GCTCAGTCTCCTGTGGGAAG-3'.

Анализ потенциальных сайтов связывания факторов транскрипции WRKY в промоторных областях генов *SSADH* пшеницы был выполнен с использованием базы данных PlantRegMap (<http://plantregmap.gao-lab.org/>). Нуклеотидные последовательности промоторных областей генов дегидрогеназы янтарного полуальдегида были взяты из базы данных NCBI.

Выделения нуклеиновых кислот проводили фенол-хлороформным методом [15].

Обратную транскрипцию для синтеза кДНК проводили с помощью набора реактивов “MMLV RT kit” (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени проводилась с использованием ранее полученной кДНК из суммарной клеточной РНК. Красителем служил SYBR Green I, а для нормализации реакции использовался ген фактора элонгации *ef-1 α* [16].

Реакция осуществлялась на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Параметры амплификации: первичная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем цикл: 95°C – 20 с, 54–59°C – 30 с, 72°C – 40 с, финальная элонгация при 72°C в течение 10 мин. При помощи программного обеспечения Opticon Monitor™

Software (Biorad, США) с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -метода были определены относительные уровни транскриптов [17].

Опыты проводили в трех биологических и четырех аналитических повторностях. Данные были подвергнуты двустороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием программного обеспечения для анализа данных STATISTICA версии 9.0 (Statsoft Wipro, USA). Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (SD). Обсуждаются статистически значимые различия при $P < 0.05$ [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования активности ПЯКДГ в листьях пшеницы при солевом стрессе указывают на увеличение анализируемого показателя сразу после третьего часа инкубации в солевом растворе, достигая максимума на 6 ч и составляя 12.15 Е/г сырой массы (рис. 1). Это значение превышает контрольное в 2.82 раза. Затем активность снижалась, приближаясь к уровню в контрольных образцах (рис. 1), достигая величины 3.85 Е/г сырой массы на 24 ч эксперимента.

Результаты анализа относительных уровней транскриптов гомеологичных генов *SSADH* в листьях пшеницы показали, что в нормальных условиях основной вклад в общий уровень экспрессии вносит ген *SSADHA*. Ген *SSADHB* практически не экспрессируется в норме. Относительный уровень экспрессии гена *SSADHD* в 23.9 раз ниже такового для *SSADHA* (рис. 2).

Исследование влияния солевого стресса на изменение относительного уровня транскриптов генов ПЯКДГ в листьях пшеницы показало их дифференциальную экспрессию в разное время эксперимента. Для *SSADHA* относительный уровень транскриптов увеличивается, достигая максимального значения к 6 ч инкубации. В дальнейшем, уровень транскриптов исследуемого гена снижается, достигая значений ниже контрольных в 1.4 раза (рис. 3). Уровень транскриптов гена *SSADHB* на протяжении всего эксперимента уменьшается, к 24 ч достигая значения в 1.9 раза ниже контрольного (рис. 3). Характер изменения уровня транскриптов *SSADHD* схож с таковым для *SSADHA*. Максимальную величину показатель принимает за 6 ч инкубации, а к 24 ч снижается в 3.5 раза по сравнению с контрольным (рис. 3).

Установлено, что общий уровень транскриптов обусловлен экспрессией триады (А, В, D) гомеологичных генов, при этом, каждый из них вносит неравнозначный вклад (рис. 4). Основной вклад в уровень мРНК исследуемого фермента при солевом стрессе вносит ген *SSADHA* (от 95.4 до 98%). Засоление незначи-

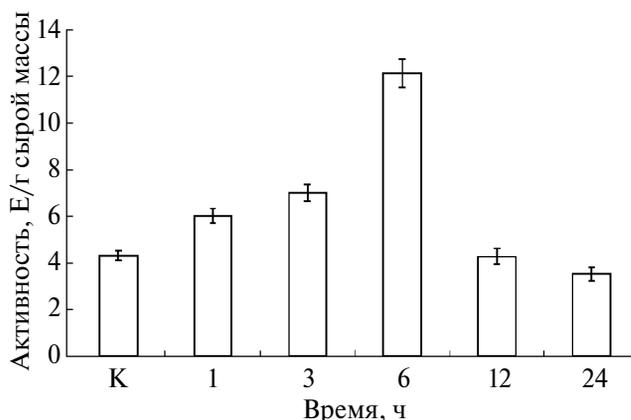


Рис. 1. Активность дегидрогеназы полуальдегида янтарной кислоты в листьях пшеницы при засолении. Ось абсцисс – время инкубации в 150 мМ растворе NaCl; К – контрольный образец. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль янтарного полуальдегида за 1 мин при 25°C.

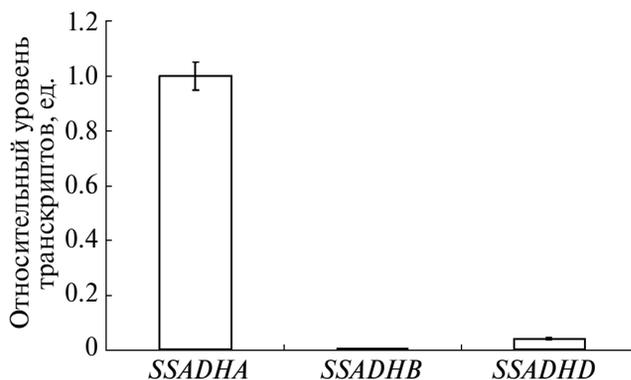


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов генов *SSADHA*, *SSADHB* и *SSADHD* в листьях пшеницы, выращенной гидропонным методом с интенсивностью света 90 мкмоль квантов/(м² с), при температуре окружающей среды 25°C без инкубации в 150 мМ растворе NaCl.

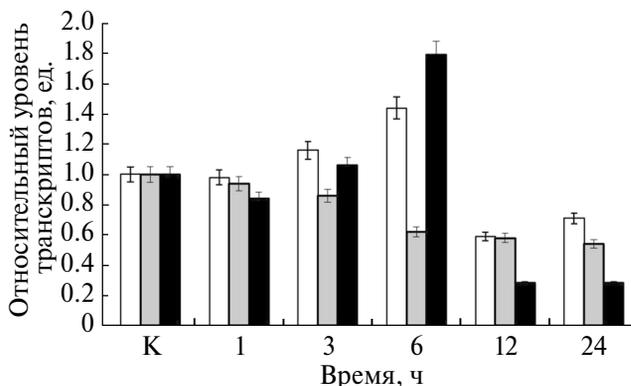


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов генов *SSADHA* (белые столбцы), *SSADHB* (серые столбцы) и *SSADHD* (черные столбцы) в листьях пшеницы в стрессовых условиях. Ось абсцисс – время инкубации в 150 мМ растворе NaCl; К – контрольный образец.

тельно влияет на экспрессию гена *SSADHB*, что в целом указывает на невысокую долю транскриптов *SSADHB* в листьях пшеницы при действии стрессового фактора. Можно отметить активацию гена *SSADHD* в условиях солевого стресса и небольшое увеличение его доли в общем уровне транскрипции на 6 ч эксперимента (5% от общего уровня) (рис. 4).

У высших растений одним из крупнейших семейств транскрипционных факторов, играющих важную роль в ответной реакции на биотический и абиотический стресс, является семейство *WRKY* [19]. Транскрипционные факторы *WRKY* связывают специфическую промоторную последовательность гена-мишени, известную как *W-box* (T)TGAC(C/T), положительно или отрицательно регулируя экспрессию

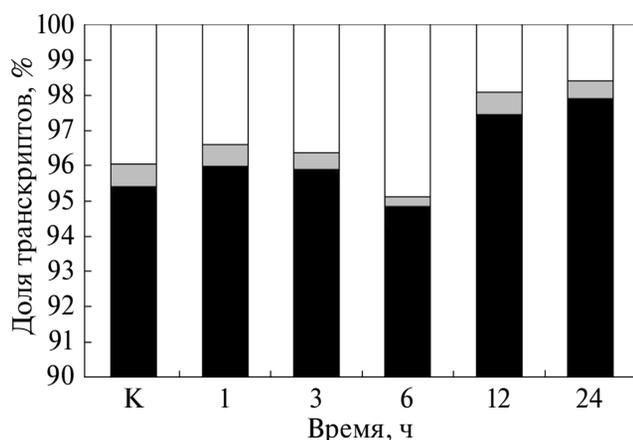


Рис. 4. Доля генов *SSADH* А-субгеномов (черные столбцы), В-субгеномов (серые столбцы) и Д-субгеномов (белые столбцы) в общем уровне содержания транскриптов дегидрогеназы полуальдегида янтарной кислоты в листьях пшеницы в стрессовых условиях.

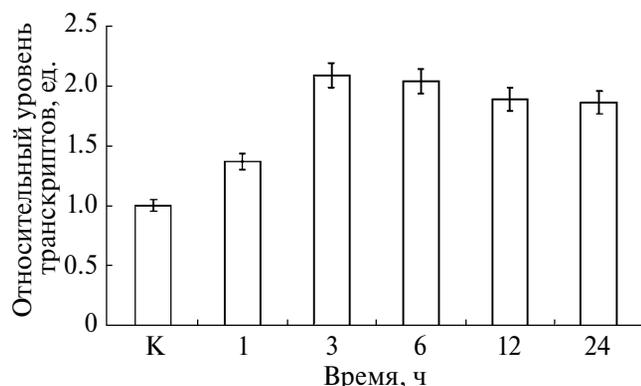


Рис. 5. Относительный уровень транскриптов гена транскрипционного фактора *WRKY3* в листьях пшеницы в стрессовых условиях. Ось абсцисс – время инкубации в 150 мМ растворе NaCl; К – контрольный образец.

генов-мишеней, которые принимают участие в физиологическом ответе на изменения в окружающей среде [20]. В промоторных областях *SSADHA* и *SSADHB* генома пшеницы были обнаружены потенциальные сайты связывания факторов транскрипции *WRKY* (W-боксы). Промотор *SSADHA* содержит 7 потенциальных сайтов связывания различных *WRKY*, среди которых был представлен *WRKY3*, активируемый при засолении (рис. 5). В промоторе *SSADHB* обнаружено 2 потенциальных сайта связывания *WRKY*. Один из них является репрессором транскрипции. В то же время, промотор *SSADHD* гена не содержал соответствующих сайтов.

В связи с этим проанализировано изменение экспрессии гена *WRKY3* и установлено увеличение содержания его мРНК в листьях пшеницы при засолении. Максимальное содержание транскриптов наблюдалось на 3 ч инкубации, превышая контрольные значения в 2 раза (рис. 5), что соотносится с высокой транскрипционной активностью гена *SSADHA* в этот период эксперимента. На протяжении дальнейшего времени экспозиции обнаружено незначительное снижение экспрессии гена *WRKY3* в листьях пшеницы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Активация ПЯКДГ в листьях пшеницы при засолении обеспечивает реорганизацию ЦТК, связанную с обходом чувствительных к засолению митохондриальных ферментов, в особенности 2-оксоглутаратдегидрогеназы [21]. Увеличение каталитической активности исследуемого фермента необходимо для поддержания высокого уровня синтеза энергетических эквивалентов за счет дополнительного поступления дыхательного субстрата в ЦТК. Активация шунта γ -аминомасляной кислоты и ПЯКДГ, как фермента, поставляющего сукцинат в ЦТК, обеспечивает необходимый окислительно-восстановительный статус клетки в условиях солевого стресса [6].

Показано, что солевой стресс активирует ПЯКДГ в листьях пшеницы на уровне генома за счет изменения транскрипции генов, кодирующих данный фермент. Установлена дифференциальная экспрессия гомологов гена *SSADH* с сильным доминированием *SSADHA*. Следовательно, регуляция каталитической активности ПЯКДГ в листьях пшеницы при солевом стрессе, вероятно, связана с изменением содержания транскриптов гена *SSADHA*. Значительное накопление мРНК гена *SSADHA* в листьях пшеницы на 6 ч экспозиции, вероятно, обуславливает синтез белковых компонентов исследуемого фермента, что приводит к увеличению его общей ферментативной активности. Наблюдаемые раз-

личия в экспрессии генов гомеологов ПЯКДГ могут быть обусловлены несколькими механизмами, включающими различие степени метилирования промоторов генов, модификациями гистонов или другими эпигенетическими особенностями организации генома пшеницы [10].

Механизмом регуляции экспрессии генов *SSADH* в листьях пшеницы могут выступать специализированные транскрипционные факторы [22]. Известно, что фактор транскрипции *WRKY* активируется в ответ на различные стрессовые условия и модулирует работу многих генов, участвующих в адаптации растений [23, 24]. Ранее было установлено, что увеличение экспрессии *WRKY3* в томатах усиливало транскрипционную активность генов, участвующих в управлении абиотическим стрессом, транспорте ионов и воды, а также клеточной детоксикации [25]. Следовательно, *WRKY3* является регулятором толерантности к осмотическому стрессу у растений, обеспечивающим контроль транскрипционной активности генов за счет взаимодействия со специфическими сайтами в их промоторных областях. Активация гена *SSADHA* может быть связана с усилением экспрессии гена *WRKY3*, так как данный транскрипционный фактор может связываться с промоторами генов *SSADHA* и *SSADHB* фермента ПЯКДГ, в составе которых обнаружены специфические сайты для данного фактора транскрипции. Анализ полученных данных по распределению сайтов транскрипционных факторов в промоторах генов ПЯКДГ свидетельствует о высокой вероятности их регуляции фактором *WRKY3*, участвующем в геномной регуляции листьев в условиях абиотического стресса [26]. В исследованных последовательностях промоторов генов ПЯКДГ был обнаружен набор различных сайтов связывания, соответствующих транскрипционным факторам типа *WRKY*, из них один расположен в области инициации транскрипции гена *SSADHA* на удалении 388 п.н. от структурной части гена и на удалении 324 п.н. от TATA-бокс, что является важным элементом контроля взаимодействия с РНК-полимеразой [27, 28].

Таким образом установлено, что солевой стресс вызывает увеличение активности дегидрогеназы янтарного полуальдегида в листьях пшеницы, что может быть обусловлено активацией транскрипции гена *SSADHA* при действии солевого стресса. Базовый вклад в изменение содержания мРНК фермента ПЯКДГ вносит ген *SSADHA*-субгенома, в промоторной области которого обнаружены специфические сайты для солевывисимого фактора транскрипции *WRKY*. Увеличение содержания транскриптов фактора *WRKY* в листьях пшеницы при солевом стрессе обеспечивает молекулярный механизм регуляции транскрипции гена *SSADHA* при адаптации

растений к стрессовому фактору. ПЯКДГ отвечает за поступление сукцината в цикл Кребса посредством окисления сукцинатного полуальдегида. Полученный НАДН в реакциях ЦТК затем может быть использован митохондриальной ЭТЦ, что позволяет модулировать окислительно-восстановительный и энергетический статус клетки при солевом стрессе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгополова Н.В., Скрипин В.А., Шершинева О.М., Алябьева Ю.В. Значение озимой и яровой пшеницы в производстве продуктов питания // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2009. Т. 5. №. 5. С. 52.
2. Glover N.M., Redestig H., Dessimoz C. Homoeologs: what are they and how do we infer them? // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 609. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.02.005>
3. Levy A.A., Feldman M. Evolution and origin of bread wheat // Plant Cell. 2022. V. 34. P. 2549. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac130>
4. Tavakkoli E., Fatehi F., Coventry S., Rengasamy P., McDonald G.K. Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 2189. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq422>
5. Yang Y., Guo Y. Unraveling salt stress signaling in plants // J. I. Plant Biol. 2018. V. 60. P. 796. <https://doi.org/10.1111/jipb.12689>
6. Che-Othman M.H., Jacoby R.P., Millar A.H., Taylor N.L. Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress // New Phytol. 2020. V. 225. P. 1166. <https://doi.org/10.1111/nph.15713>
7. Yuan D., Wu X., Gong B., Huo R., Zhao L., Li J., Lü G., Gao H. GABA metabolism, transport and their roles and mechanisms in the regulation of abiotic stress (hypoxia, salt, drought) resistance in plants // Metabolites. 2023. V. 13. P. 347. <https://doi.org/10.3390/metabo13030347>
8. Wu X., Jia Q., Ji S., Gong B., Li J., Lü G., Gao H. Gamma-aminobutyric acid (GABA) alleviates salt damage in tomato by modulating Na⁺ uptake, the GAD gene, amino acid synthesis and reactive oxygen species metabolism // BMC Plant Biol. 2020. V. 20: 465. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02669-w>

9. Fedorin D.N., Eprintsev A.T., Florez Caro O.J., Igamberdiev A.U. Effect of salt stress on the activity, expression, and promoter methylation of succinate dehydrogenase and succinic semialdehyde dehydrogenase in maize (*Zea mays* L.) leaves // *Plants*. 2022. V. 12. P. 68. <https://doi.org/10.3390/plants12010068>
10. Ramirez-Gonzalez R.H., Borrill P., Lang D., Harrington S.A., Brinton J., Venturini L., Davey M., Jacobs J., van Ex F., Pasha A., Khedikar Y., Robinson S.J., Cory A.T., Florio T., Concia L. The transcriptional landscape of polyploid wheat // *Science*. 2018. V. 361. P. Eaar6089. <https://doi.org/10.1126/science.aar6089>
11. Banerjee A., Roychoudhury A. WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses // *Sci. World J.* 2015. V. 2015. Article ID 807560 <https://doi.org/10.1155/2015/807560>.
12. AbdElgawad H., Zinta G., Hegab M.M., Pandey R., Asard H., Abuelsoud W. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7: 276. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00276>
13. Землянухин А.А. Большой практикум по физиологии растений. Воронеж: Изд-во Воронежского университета. 1996. 184 с.
14. Huang X.Q., Brule-Babel A. Development of genome-specific primers for homoeologous genes in allopolyploid species: the waxy and starch synthase II genes in allohexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) as examples // *BMC Res. Notes*. 2010. V. 3. P. 140. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-140>
15. Vennapusa A.R., Somayanda I.M., Doherty C.J., Jagadish S.K. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 16887. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73958-5>
16. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 2907. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
17. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
18. Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа, 1990. 351 с.
19. Wei K., Chen J., Chen Y., Wu L., Xie D. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize // *DNA Res.* 2012. V. 19. P. 153. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsr048>
20. Silva Monteiro de Almeida D., Oliveira Jordão do Amaral D., Del-Bem L-E., Bronze dos Santos E., Raner José Santana S., Karina Peres G., Michel V., Fabienne M. Genome-wide identification and characterization of cacao WRKY transcription factors and analysis of their expression in response to witches' broom disease // *PLoS One*. 2017. V. 12: e0187346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187346>
21. Che-Othman M.H., Millar A.H., Taylor N.L. Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C_3 plants // *Plant Cell Environ.* 2017. V. 40. P. 2875. <https://doi.org/10.1111/pce.13034>
22. Coleman S.T., Fang T.K., Rovinsky S.A., Turano F.J., Moye-Rowley W.S. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007103200>
23. Zhou S., Zheng W.-J., Liu B.-H., Zheng J.-C., Dong F.-S., Liu Z.-F., Wen Z.-Y., Yang F., Wang H.-B., Xu Z.-S., Zhao H., Liu Y.-W. Characterizing the role of *TaWRKY13* in salt tolerance // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 5712. <https://doi.org/10.3390/ijms20225712>
24. Qin Y., Tian Y., Liu X. A wheat salinity-induced WRKY transcription factor *TaWRKY93* confers multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 464. P. 428. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.128>
25. Muhovski I.H.Y., Zizkova E., Dobrev P.I., Gharbi E., Franco-Zorrilla J.M., Lopez-Vidriero I., Solano R., Clippe A., Errachid A., Motyka V., Lutts S. The *Solanum lycopersicum* WRKY3 transcription factor SlWRKY3 is involved in salt stress tolerance in tomato // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1343. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01343>
26. Kovalchuk N., Jia W., Eini O., Morran S., Pyvovarenko T., Fletcher S., Bazanova N., Harris J., Beck-Oldach K., Shavrukov Y., Langridge P., Lopato S. Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters // *Plant Biotechnol. J.* 2013. V. 11. P. 659. <https://doi.org/10.1111/pbi.12056>
27. Whitfield T.W., Wang J., Collins P.J., Partridge E.C., Aldred S.F., Trinklein N.D., Myers R.M., Weng Z. Functional analysis of transcription factor binding sites in human promoters // *Genome Biol.* 2012. V. 13: R50. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r50>
28. Shahmuradov I.A., Umarov R.Kh., Solovyev V.V. TSSPlant: a new tool for prediction of plant Pol II promoters // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45: e65. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1353>

УДК 581.1

АДАПТАЦИЯ ГАЛОФИТОВ ЛИТОРАЛИ К УСЛОВИЯМ ПРИМОРСКИХ ТЕРРИТОРИЙ БЕЛОГО МОРЯ: УЧАСТИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ

© 2024 г. Е. Ф. Марковская^{a,*}, А. А. Зорина^a, Е. Н. Гуляева^b,
А. А. Стародубцева^a, А. А. Кособрюхов^c

^aФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Петрозаводский государственный университет”, Петрозаводск, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

^cФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр
“Пушчинский научный центр биологических исследований”, Институт фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук, Пушкино, Россия

*e-mail: volev10@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Исследовали состав жирных кислот (ЖК) у четырех видов доминантных облигатных галофитов: триостренника морского *Triglochin maritima*, подорожника морского *Plantago maritima*, астры солончаковой *Tripolium pannonicum* subsp. *tripolium* и млечника морского *Lysimachia maritima*, произрастающих в разных условиях заливания на литорали Белого моря. Установлено, что содержание суммарных ЖК варьировало от 13 до 22 мг/г а.с.в с максимальными значениями у *L. maritima* и минимальными у *P. maritima*. Все виды имеют высокие значения содержания ННЖК (74–77%), индекса двойных связей (1.6–1.8) и значимый вклад триеновых ЖК (45–55%). Установлено высокое разнообразие длинноцепочечных ЖК (C20–24) – 14 ЖК. Этот анализ показал сходство всех галофитов по основным параметрам состава ЖК и высокую функциональную активность мембранных систем галофитов. Выделено два кластера видов с разным адаптивным ответом: в первый входят *P. maritima*, *Triglochin maritima* и *Tripolium pannonicum*, во второй – *L. maritima*. Сопоставление данных по двум кластерам показало, что имеются ЖК, которые участвуют в адаптации всех видов C18:3(n-3), C16:0, C18:2(n-6) и ЖК, различающиеся по кластерам. Для видов первого кластера 1 ЖК – C20:4(n-4), а для второго кластера – 4 ЖК: C18:1(n-9), C18:3(n-4), C20:1(n-9) и C22:0. Выявленные различия могут быть связаны с разными путями адаптаций галофитов двух кластеров к условиям литорали.

Ключевые слова: адаптация, галофиты, жирные кислоты, липиды, литораль, приморские территории, приливно-отливной цикл

DOI: 10.31857/S0015330324010091, EDN: NVPHNR

ВВЕДЕНИЕ

Галофиты, произрастающие на приморских экотопах, являются важнейшим компонентом прибрежных морских экосистем в разных климатических зонах [1, 2]. На приморской территории Белого моря флора насчитывает около 100 видов, из которых в условиях действия при-

ливно-отливного цикла (ПОЦ) на средней литорали произрастают порядка 10 видов [3, 4].

Условия литорали характеризуются сложным сочетанием природно-климатических условий, которые формируются под влиянием циркадной и лунной ритмики и рассматриваются как экстремальные [5]. ПОЦ на литорали обуславливает смену водной (полное затопление) и воздушной (полное осушение территории) сред дважды в сутки, что влечет за собой изменение жизненно важных факторов среды: глубины затопления, интенсивности и спектрального состава света, температуры, влажности, механического давления, уровня засоления, содержания доступного

Сокращения: ПОЦ – приливно-отливной цикл; ЖК-состав – жирнокислотный состав; НЖК – насыщенные жирные кислоты; ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты; ДЦЖК – жирные кислоты с длинной цепью (C20–24); ИДС – индекс двойных связей; SDR – стеароил-десатуразное отношение; ODR – олеил-десатуразное отношение; LDR – линолеил-десатуразное отношение; ИФ – интенсивность фотосинтеза.

кислорода, углекислого газа и др. [6–8]. Растительность приморских территорий в условиях ПОЦ высокоспецифична и адаптирована к суточному и сезонному варьированию факторов среды [6, 8]. Эти отличия связаны с особенностями морфолого-анатомических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов адаптации, которые в известной нам литературе для северных Голарктических морей остаются слабо изученными.

Считается, что в условиях приморских территорий наиболее экстремальными факторами для произрастания растений на литорали в условиях ПОЦ являются засоление и гипоксия. Имеется большое количество работ по механизмам солеустойчивости галофитов [1, 7, 9], но исследования устойчивости растений в условиях ПОЦ единичны. Солеустойчивость галофитов рассматривается как комбинированное свойство, которое формируется только в условиях соленой воды и обеспечивает устойчивость к гипоксии [10]. Большое внимание уделяется негативному влиянию гипоксии и постгипоксического синдрома на рост, продуктивность и распространение растений в естественных условиях действия ПОЦ на литорали. Резкая смена факторов среды во время динамики ПОЦ приводит к изменению газового состава тканей растений (увеличение содержания этилена, оксида азота) и увеличению образования АФК [11]. Этилен координирует сигнальные пути для облегчения морфологических и анатомических изменений, включая образование аэренхимы [12], и препятствует закрытию устьиц в присутствии АБК [13], что обеспечивает поддержание подводного фотосинтеза. Наличие открытых устьиц у галофитов литорали Белого моря при затоплении во время ПОЦ в условиях круглосуточной освещенности показано в работе [14].

Из метаболических систем особый интерес вызывают липиды, которые повсеместно участвуют в регуляции реакции растений на гипоксию и постгипоксическую реоксигенацию [15]. Жизненно важным компонентом метаболизма растений галофитов является ЖК-состав липидов как структурная основа мембран и энергетический резерв растительных клеток [5]. Липиды рассматриваются как участники передачи сигналов в реакции растений на биотический и абиотический стрессы [15–17]. Так, в реакции растений на действие ПОЦ активируются липидопосредованные сигнальные каскады, обеспечивающие поддержание устойчивости в нестабильных условиях среды. Работы по ЖК-составу липидов и их функциональной активности у высших сосудистых растений приморских территорий северных Голарктических морей отсутствуют.

Цель работы – выявление ЖК-состава общих липидов и исследование его вклада в адаптацию доминантных облигатных галофитов Белого моря по градиенту затопления к условиям литорали эстуарной части р. Кереть.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Район исследования. Работы проводились в 2019 – 2020 гг. на Карельском берегу Кандалакшского залива Белого моря в окрестностях поселка Кереть в приливном эстуарии реки Кереть (66°17'33" с. ш., 33°35'28" в. д.), представляющем собой бухту ковшового типа. Это характерная для Белого моря акватория со сложным рельефом дна и усиленным гидродинамическим режимом, который во многом определяется приливо-отливной динамикой. Средняя величина приливов от 2 до 3.5 м; соленость вод залива во время прилива понижается на литорали до 20–22‰, а вблизи устья – до 3–12‰ [3].

Район исследования располагается в умеренном поясе и относится к зоне тайги, подзоне средней тайги. Климат умеренно-континентальный с чертами морского. Лето короткое и прохладное, зима длинная и теплая. Безморозный период длится с конца мая до конца августа, вегетационный период составляет 109–119 дней. Погода в течение года имеет неустойчивый характер и отличается избыточным увлажнением, в среднем за год выпадает 550–650 мм осадков. Средняя температура воздуха летом составляет 13–14°C, воды – 14–15°C. Влажность воздуха в летние месяцы изменяется в пределах 66–72%. В регионе в течение двух летних месяцев (июнь, июль) отмечается полярный день (Архив погоды, <https://world-weather.ru/pogoda/russia/keret/sunrise/>).

В период взятия проб температура воздуха составляла 13–15°C с максимальными значениями +21°C. Соленость воды в местах исследования составила около 7‰, почвы – около 15‰. Температура воды во время прилива на средней литорали составила 15°C, а на верхней литорали – 18°C.

Объекты исследования. Работа выполнена на четырех видах доминантных облигатных галофитов:

Lysimachia maritima (L.) Galasso, Banfi & Oldano (синоним *Glaux maritima*) – млечник морской, семейство *Primulaceae*, класс *Magnoliopsida*. Многолетнее корневищное растение слабо ветвистое высотой 10–15 см. Циркумбореальный вид [3].

Plantago maritima – подорожник морской, семейство *Plantaginaceae*, класс *Magnoliopsida*. Циркумбореальный вид [3].

Tripolium pannonicum subsp. *tripolium* (L.) Greuter (синонимы *Aster tripolium*, *Tripolium vulgare*) – астра солончаковая, семейство

Asteraceae. класс Magnoliopsida. Бореальный евроазиатский вид [3].

Triglochin maritima L. — триостренник морской, семейство *Juncaginaceae*, класс Liliopsida. Плюризональный циркумполярный вид [3].

Латинские название видов приведены по World flora online Plant List (<https://wfoplantlist.org/plant-list>).

Все перечисленные виды подвергаются глубокому затоплению, но разной продолжительности в зависимости от места их произрастания. Млечник морской растет на верхней литорали и время его заливания составляет около 50 мин в ПОЦ, а триостренник, подорожник, астра растут на средней литорали и залиты около трех часов в ПОЦ.

Методы исследования. Сбор проб выполнен в ритмике ПОЦ после отлива, когда все опытные растения находились в наземно-воздушной среде. Для исследования липидов были отделены листья со средней части стебля (розетки) с 4–8 опытных растений каждого вида и получены суммарные пробы листьев. Для каждого вида из суммарной пробы были взяты по две биологические пробы, которые анализировали в трех повторностях. Суммарные пробы листьев каждого вида фиксировали жидким азотом с последующим лиофильным высушиванием. Исследование ЖК-состава суммарных липидов проводили в аналитической лаборатории Института леса КарНЦ РАН по стандартной методике [18]. Для определения состава липидов растительный материал фиксировали в термостате при температуре 110°C в течение 30 мин. Такую пробоподготовку выполняли для инактивации гидролитических ферментов, расщепляющих или трансформирующих нативные глицеролипиды при гомогенизации. Суммарные липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола в соотношении 2 : 1. Определение ЖК-состава проводили хроматографическим методом на газожидкостном хроматографе “Хроматэк-Кристалл-5000.1” (Россия) при следующих условиях: капиллярная колонка HP INNOWAX (30 м; 0.32 мм); температура колонки, испарителя, пламенно-ионизационного детектора — 205, 240 и 260°C соответственно; газ-носитель — азот; скорость пропускания через колонку азота, водорода, воздуха — 50, 40, 400 мл/мин соответственно. Идентификацию ЖК-состава осуществляли по стандартным образцам (Supelko, 37 компонентов), для определения ЖК проводили сравнение по времени удерживания стандартных образцов и табличных данных [19]. Определение количественного содержания ЖК осуществляли методом внутреннего стандарта (в качестве стандарта — маргаритиновая кислота), выражали в мкг/г а.с.в. и пересчитывали в %.

Индекс двойных связей (ИДС), коэффициент ненасыщенных жирных кислот (К), активность ацил-липидных мембранных десатураз (n-9 — SDR, n-12 — ODR, n-3 — LDR) рассчитывали по формулам, приведенным в статье [20].

Статистическая обработка выполнялась в среде Microsoft Excel, STATGRAPHICS Plus 5.0 и бесплатном пакете PAST v3.17. Кластерный анализ [21] использовался для выявления сходства четырех видов галофитов, а метод главных компонент — для объяснения причин разной реакции видов на экстремальные условия среды и для выявления роли ЖК-липидов в структурно-функциональной адаптации галофитов к условиям приливно-отливной зоны приморских сообществ Белого моря. В основе расчетов лежат исходные количественные данные (мкг/г а.с.в.) по ЖК суммарных липидов, для подтверждения результатов применения методов многомерной статистики проводилось 500 итераций бутстрепинга [22].

В таблицах приведены для каждого вида средние арифметические значения из двух биологических и трех аналитических повторностей и их стандартные ошибки ($n \geq 3$). Для оценки достоверности различий использовали непараметрические критерии (критерий Уилксона-Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова или Пирсона). Статистически значимыми считали различия при $P <$ или ≤ 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общее содержание ЖК у исследованных галофитов изменялось в диапазоне от 13.2 мг/г а.с.в. у подорожника до 21.7 мг/г а.с.в. у млечника. В состав липидов у исследованных видов входило 29 ЖК с длиной углеродных цепей от 16 до 24: С16 ряда — 8 ЖК, С18 — 7 ЖК, С20 — 7 ЖК, С22 — 6 ЖК, С24 — 1 вид ЖК. Наименее разнообразный состав оказался у астры — 23 ЖК, а у остальных по 26 ЖК.

Суммарное содержание насыщенных ЖК (НЖК) у приморских галофитов находилось в диапазоне от 22.6% у астры до 25.9% у подорожника (табл. 1). Основной НЖК у изученных видов является пальмитиновая (С16:0), содержание которой изменялось в диапазоне 18.3–19.9%. У всех галофитов в составе НЖК отмечены и другие кислоты: стеариновая (С18:0) с содержанием 2.4–3.7% и группа насыщенных жирных кислот с длинной цепью (ДЦЖК): арахидиновая (С20:0) — 0.3–1.0%, бегеновая (С22:0) — 0.3–0.7%, лигноцериновая (С24:0) — 0.9–1.4%.

Группа ненасыщенных ЖК (ННЖК) различалась по числу двойных связей (моно — тетраеновые); их суммарное содержание составило 76.5 у триостренника, 77.4 у астры, 74.9 у млечника и 74.1% у подорожника. Большая доля

Таблица 1. Состав жирных кислот (ЖК) суммарных липидов (% от суммы) у галофитов литорали

ЖК	<i>Triglochin maritima</i>	<i>Tripolium pannonicum</i>	<i>Plantago maritima</i>	<i>Lysimachia maritima</i>
C16:0	18.3	18.3	19.4	19.9
C16:1(n-7)	0.4	0.3	0.5	1.4
C16:1(n-5)	0.6	0.7	0.9	1.1
C16:2(n-9)	0.5	<0.1	<0.1	0.2
C16:3(n-7)	сл	–	<0.1	0.2
C16:3(n-6)	0.5	0.5	0.4	0.4
C16:3(n-4)	сл	<0.1	<0.1	0.2
C16:3(n-3)	0.7	–	–	–
C18:0	3.2	2.4	3.5	3.7
C18:1(n-9)	3.3	2.9	3.6	4.9
C18:1(n-7)	0.1	–	0.3	0.8
C18:2(n-6)	12.8	12.0	8.0	13.9
C18:3(n-6)	0.1	0.1	<0.1	0.1
C18:3(n-4)	0.3	0.2	0.2	0.7
C18:3(n-3)	49.7	54.0	50.1	43.0
C20:0	0.3	0.5	1.0	0.3
C20:1(n-9)	0.1	0.1	0.1	0.2
C20:2(n-9)	1.6	0.5	0.7	1.5
C20:2(n-6)	–	0.1	–	<0.1
C20:2(n-3)	0.1	–	–	–
C20:3(n-3)	<0.1	0.2	<0.1	<0.1
C20:4(n-4)	4.3	3.0	6.6	2.8
C22:0	0.7	0.4	0.6	0.3
C22:1(n-9)	<0.1	–	<0.1	–
C22:2(n-9)	0.4	2.1	0.2	1.5
C22:2(n-4)	0.7	0.8	1.9	1.9
C22:2(n-3)	0.2	<0.1	0.3	0.1
C22:4(n-4)	0.2	–	0.3	0.1
C24:0	0.9	1.0	1.4	0.9

Примечание: в таблице приведены средние значения, сл. – следовые количества, прочерк – не обнаружены в составе.

от общего числа ЖК приходилась на ННЖК С18-ряда: у триостренника – 66.3, у астры – 69.1, у млечника – 63.3 и подорожника – 69%. У изученных видов идентифицированы моноеновые (4.0–8.3%), диеновые (10.9–17.6%), триеновые (44.6–54.9%), тетраеновые (2.9–6.9%) ЖК. Среди моноеновых доминировала группа n-9 ЖК: С18:1(n-9), С20:1(n-9) и С22:1(n-9). Преобладала олеиновая кислота (С18:1(n-9)), содержание которой составило 3.3 у триостренника, 2.9 у астры, 4.9 у млечника и 3.6% у подорожника. Содержание С16:1(n-7) составило у триостренника 1.1, у астры 1.0, у млечника 2.4, у подорожника – 1.4%. Из семейства n-6 диеновых ЖК у всех видов доминировала линолевая кислота С18:2(n-6), ее содержание изменялось между видами от 12.0% у астры до 13.9% у млечника. Наибольший процент содержания ЖК приходился на триеновые ЖК. Среди них были обнаружены три ЖК: С16:3(n-6), С18:3(n-6) и С18:3(n-3). На долю α -линоленовой кислоты С18:3(n-3) приходилось у астры 54.2%, триостренника 50.1% и подорожника 50.3%, а у млечника несколько ниже – 43.7%.

Одной из особенностей исследованных галофитов литорали Белого моря является большое

разнообразие ДЦЖК. Так, у исследованных растений были выявлены 14 ДЦЖК, три из которых входят в группу НЖК: арахидовая (С20:0), бегеновая (С22:0) и лигноцереновая (С24:0) кислоты. Длинноцепочечные ННЖК галофитов Белого моря включают 11 видов ЖК с большим разнообразием положения двойных связей внутри групп: С20:1(n-9); С20:2(n-3, n-6, n-9); С20:3(n-3); С20:4(n-4); С22:1(n-9), С22:2(n-3), (n-4, n-9); С22:4(n-4). Суммарное содержание ДЦЖК составило у триостренника 9.7%, у астры – 8.8%, у млечника – 9.8% и у подорожника – 13.3%.

Известно, что ЖК придают клеточным мембранам текучесть, необходимую для поддержания их структурного и функционального состояния. Свойства мембран зависят от соотношения насыщенных и ненасыщенных ЖК [23]. Для оценки их состояния использовали индекс двойной связи (ИДС). По величине его значения виды различались незначительно (1.6–1.81) (табл. 2). Степень ненасыщенности ЖК определяется функционированием десатураз. Расчет активности ацил-липидных n-9 (SDR), n-12 (ODR), n-3 (LDR) десатураз показал, что различия для SDR между видами составили 17%, для ODR 11%, а для LDR – около 20%. Можно отметить более высокие значения активности фермента SDR для млечника, ODR у триостренника, а LDR – для подорожника (табл. 2).

Для установления достоверности сходства растений по составу общих ЖК был проведен кластерный анализ, в результате которого выделено два кластера галофитов, отличающихся с доверительной вероятностью >95% (рис. 1). В первый кластер вошли три вида – подорожник, триостренник и астра, а во второй – млечник. Для трактовки дифференциации растений в зависимости от ЖК-состава липидов был использован метод главных компонент и сравнение направления изменчивости содержания и состава ЖК. Выделилось две компоненты: первая имеет большую дисперсию (от 94 до 98%); на вторую компоненту приходятся только от 1 до 4%. Так, для подорожника на первую главную компоненту приходилось 96% изменчивости (PC1 = 96%, PC2 = 3%); для триостренника 96% (PC1 = 96%, PC2 = 3%); для астры 98% (PC1 = 98%, PC2 = 1%); для млечника 94% (PC1 = 94%, PC2 = 4%). Проведенный анализ содержания ЖК у видов-галофитов первого кластера (подорожник, астра, триостренник) показал, что наиболее значимый вклад в их адаптацию достигается увеличением количества таких ЖК, как С18:3(n-3), С16:0, и за счет изменения соотношения С18:2(n-6) и С20:4(n-4). Галофит второго кластера (млечник) адаптируется за счет повышения содержания С18:3(n-3), С18:2(n-6), С16:0 и количественной нестабильности С18:1(n-9),

Таблица 2. Индекс двойной связи и активность десатураз у исследованных видов

Вид	ИДС	SDR	ODR	LDR
<i>Triglochin maritima</i>	1.81	0.49	0.81	0.69
<i>Tripolium pannonicum</i>	1.76	0.56	0.76	0.66
<i>Plantago maritima</i>	1.71	0.50	0.72	0.78
<i>Lisimachia maritima</i>	1.63	0.60	0.73	0.63

Примечание: ИДС – индекс двойных связей, SDR – стеариол-десатуразное отношение, ODR – олеил-десатуразное отношение, LDR – линолеил-десатуразное отношение.

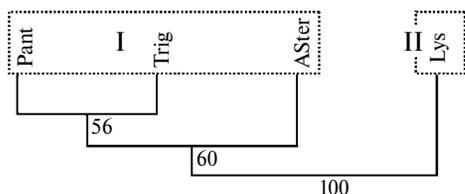


Рис. 1. Дендрограмма сходства видов по составу жирных кислот суммарных липидов у галофитов (подорожник – Pant., триостренник – Trig., астра – Aster, млечник – Lys.), полученная методом ближайшего соседа по матрице нормированных евклидовых дистанций с нанесенными оценками бутстреп-вероятностей ветвей; пунктиром разделены кластеры растений с доверительной вероятностью > 95%.

C18:3(n-4), C20:1(n-9) и C22:0. Если в общую адаптацию видов первого кластера включено четыре ЖК, то у вида второго кластера — семь ЖК.

Сопоставление полученных данных по двум кластерам показало, что в адаптации всех галофитов в условиях литорали участвуют три ЖК — C18:3(n-3), C16:0, C18:2(n-6), которые, по-видимому, и определяют основное направление адаптации, связанное с поддержанием текучести мембранных систем растений в функционально активном состоянии в динамической среде литорали. А такие ЖК, как C20:4(n-4) у первого кластера и ЖК C18:1(n-3), C18:3(n-4), C20:1(n-9), C22:0 у второго кластера — определяют различия в путях адаптации [24], что и приводит к разному положению галофитов по градиенту условий на литорали. Кластерный и компонентный анализы показали, что виды двух групп имеют разные адаптационные механизмы, основанные на участии ЖК-состава липидов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование состава и количества ЖК у четырех видов литорали показало высокие и сходные значения содержания ННЖК, ИДС, α -линоленовой и линолевой кислот (60–70% от общей суммы), что свидетельствует об успешности адаптации галофитов к условиям литорали и подтверждается данными литературы [23, 24]. Сравнение всех исследованных галофитов показало их большое сходство по доминантным ЖК и расчетным показателям их активности, что может быть связано с большой специфичностью, экстремальностью и уникальностью этих условий и, как следствие, с однотипной реакцией показателей липидного метаболизма у разных видов независимо от их биологии и происхождения и времени появления на этой территории [2–4]. Особенностью видов приморских территорий Белого моря является высокое содержание и разнообразие ДЦЖК у всех галофитов, что сходно с видами побережий более южных морей [5] и также подтверждает важность этой группы ЖК и специфичность территории. Из литературных источников известно, что отношение линоленовой к линолевой ЖК C18:3(n-3)/C18:2(n-6) рассматривается как показатель нормального развития растений, и оно должно быть не менее 2, как было показано на ячмене [25]. Исследованные галофиты имели значения этого показателя от 3.1 до 6.2, что может свидетельствовать об успешности их произрастания на литорали и подтверждается не только прохождением всех этапов онтогенетического развития, но и успешным семеношением [2, 3].

Вместе с тем, использование математических методов показало, что изучаемые виды разошлись на два кластера с участием минорных ЖК

и это может быть связано с разными условиями произрастания на литорали. Важно отметить, что все галофиты — наземные растения, адаптированные к нестабильным условиям литорали. Так, растения первого кластера более длительное время могут находиться в условиях водной среды, а второго кластера — наземно-воздушной.

Виды первого кластера испытывают длительное затопление (около трех часов в ПОЦ), недостаток CO_2 и O_2 и ингибирование фотосинтеза, для них характерно подключение минорной арахидоновой ЖК C20:4(n-4). Вклад этой ЖК может быть связан с повышением системной устойчивости растений к абиотическим и биотическим повреждающим факторам, в том числе к длительному заливанью [24]. Все галофиты первого кластера имеют большую биомассу, чем растения второго кластера.

Млечник, вид второго кластера, галофит верхней литорали, криногалофит, испытывает кратковременное (около 50 мин в ПОЦ), но полное заливание, а все остальное время находится в условиях наземно-воздушной среды и длительной освещенности в полярный день, занимая узкий экологический нишу на стыке сред [2, 3]. И в этих условиях отмечается активное включение в метаболизм повышенного содержания четырех ЖК: C18:1(n-3), C18:3(n-4), C20:1(n-9), C22:0. Так, участие олеиновой ЖК C18:1(n-9) может быть связано с активизацией системы сигналинга. Кроме того, олеиновая ЖК C18:1(n-9) совместно с ЖК C22:0 может принимать участие в формировании системной устойчивости организма. Гондоиновая ЖК C20:1(n-9) служит источником синтеза биологически активных веществ [26], которые также могут увеличивать устойчивость. Ранее было показано [27], что условия обитания вида второго кластера, млечника морского, на стыке литорали и sublиторали являются крайне неблагоприятными и растение имеет среди галофитов максимальные значения ИФ (38.7 ± 0.6 мкмоль $\text{CO}_2 \text{ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) и минимальные значения накопления биомассы (0.7 ± 0.1 г), что свидетельствует о его неблагоприятном энергетическом балансе, который тратится в большей степени на системы поддержания, а не на увеличение массы [26–28]. Важно отметить, что млечник морской в условиях Беломорского побережья находится на границе ареала вида [3]. Виды первого класса различаются по величине ИФ (от 36.9 ± 1.1 до 8.4 ± 1.2 мкмоль $\text{CO}_2 \text{ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), но их биомасса за вегетацию составила (от 34.8 ± 10.0 до 8.7 ± 2.1 г), что свидетельствует о более высоких величинах накопления массы и, соответственно, высокой энергетической эффективности работы фотосинтетического аппарата растений [27, 28].

Проведенные исследования показали, что в составе доминантных ЖК липидов у исследованных галофитов основная роль отводится

C18:3(n-3), C16:0, C18:2(n-6), которые обеспечивают их адаптацию по градиенту условий на средней и верхней литорали. Однако в этом процессе участвуют минорные ЖК, которые различаются у видов первого кластера C20:4(n-4) и видов второго кластера (C18:1(n-3), C18:3(n-4), C20:1(n-9), C22:0). Считаем, что степень неблагоприятности условий для галофитов литорали может быть связана не только с полным заливанием (триостренник, астра и подорожник), но и с длительным периодом нахождения растений в условиях воздушной среды (млечник). Можно отметить факт уменьшения количества ЖК у видов первого кластера, участвующих в адаптации, что связано с более благоприятными условиями жизнедеятельности. На растениях Арктики было показано, что при сходных показателях функциональной активности ЖК-состава липидов у редких локально адаптированных видов флоры Шпицбергена отмечалось увеличение числа ЖК и снижение эффективности работы фотосинтетического аппарата растений [29].

Следует отметить, что фактор заливания в ритме ПОЦ в естественных условиях произрастания растений на литорали и фактор длительного затопления растений в природе, в частности, ранней весной, принципиально различаются. В результате длительной эволюции для галофитов в естественных условиях жизни на литорали периодическое кратковременное заливание — это условие жизни организма в ритмике ПОЦ, к которому они по-разному, но адаптированы. Экстремальность условий для млечника на литорали в большей степени связана, по-видимому, с краем его географического ареала в условиях Субарктики.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Flowers T.J., Colmer T.D.*, Plant salt tolerance: adaptations in halophytes // *Ann. Bot.* 2015. V. 115. P. 327.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcu267>
2. *Марковская Е.Ф., Сергиенко Л.А., Шкляревич Г.А., Сони́на А.В., Стародубцева А.А., Смолькова О.В.* Природный комплекс побережий Белого моря. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2010. 85 с.
3. *Заславская Н.В.* Флора и растительность засоленных приморских экотопов Западного побережья Белого моря. Дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск. 2007, 193 с.
4. *Сергиенко Л.А.* Флора и растительность побережий Российской Арктики и сопредельных территорий. Петрозаводск: ПетрГУ, 2008. 225 с.
5. *Kim Y.A., Um Y.-R., Lee J.-I., Kim H.-J., Lim S.-Y., Nam T.-J., Seo Y.-W.* Comparative studies on the fatty acid compositions of the Korean salt marsh plants in the West Sea // *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 2009. V. 24. P. 521.
6. *Touchette B.W.* Seagrass-salinity interactions: Physiological mechanisms used by submersed marine angiosperms for a life at sea // *JEMBE.* 2007. V. 350. P. 194.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.05.037>
7. *Touchette B.W., Smith G.A., Rhodes K.L., Poole M.* Tolerance and avoidance: Two contrasting physiological responses to salt stress in mature marsh halophytes *Juncus roemerianus* Scheele and *Spartina alterniflora* Loisel // *JEMBE.* 2009. V. 380. P. 106.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.08.015>
8. *Rasool S.G., Siddiqui H., Hameed A., Hussain T., Aziz I., Khan A., Gulzar S.* Temporal variations in water and ion relations in coastal halophytes // *Sabkha Ecosystems. Tasks for Vegetation Science.* 2019. V. 49. P. 447.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-04417-6_27
9. *Иванищев В.В.* О механизмах солеустойчивости растений и специфики влияния засоления // *Изв. ТулГУ. Естественные науки.* 2019. Т 4. С. 76.
10. *Keiffer C.H., McCarthy B.C., Ungar I.A.* Effect of salinity and waterlogging on growth and survival of *Salicornia europaea* L., an inland halophyte // *Ohio J. Sci.* 1994. V 94. P. 70.
11. *Voesenek L.A.C.J., Bailey-Serres J.* Flood adaptive traits and processes: an overview // *New Phytol.* 2015. V. 206. P. 57.
<https://doi.org/10.1111/nph.13209>
12. *Joshi R., Kumar P.* Lysigenous aerenchyma formation involves non-apoptotic programmed cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2012. V. 18. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s12298-011-0093-3>
13. *Yeung E., van Veen H., Vashisht D., Sobral Paiva A.L., Hummel M., Rankenberg T., Steffens B., Steffen-Heins A., Sauter M., de Vries M., Schuurink R.C., Bazin J., Bailey-Serres J., Voesenek L.A.C.J., Sasidharan R.* A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *PNAS.* 2018. V. 115. P. E6085.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1803841115>
14. *Markovskaya E.F., Gulyaeva E.N.* Role of stomata in adaptation of *Plantago maritima* L. plants to tidal dynamics on the White Sea coast. // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2020. V. 67. P. 68.
<https://doi.org/10.1134/S1021443719060086>
15. *Xie L.-J., Zhou Y., Chen Q.-F., Xiao S.* New insights into the role of lipids in plant hypoxia responses // *Prog. Lipid Res.* 2021. V. 81. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101072>

16. Wang X. Lipid signaling // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 329.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.012>
17. Lung S.-C., Chye M.-L. Arabidopsis acyl-CoA-binding proteins regulate the synthesis of lipid signals // New Phytol. 2019. V. 223. P. 113.
<https://doi.org/10.1111/nph.15707>
18. Шуляковская Т.А., Ильинова М.К., Карелина Т.В. Липидный состав тканей ствола *Betula pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Betulaceae) // Растительные ресурсы. 2014. Т. 50. С. 94.
19. Jamieson G.R. GLC identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // J. Chromatogr. Sci. 1975. V. 13. P. 491.
20. Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород Центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации. 2. Особенности метаболизма жирных кислот фосфолипидов меристем *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. // Химия растительного сырья. 2009. Т. 2. С. 71.
21. Коросов А.В. Специальные методы биометрии. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2007. 363 с.
22. Шитиков В.К., Розенберг Г.С. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти: Кассандра, 2013. 314 с.
23. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир, 2014. 372 с.
24. Zhukov A.V. Very long-chain fatty acids in composition of plant membrane lipids. // Russ. J. Plant. Physiol. 2018. V. 65. P. 784.
<https://doi.org/10.1134/S1021443718050187>
25. Laskay G., Lehoczki E. Correlation between linolenic-acid deficiency in chloroplast membrane lipids and decreasing photosynthetic activity in barley // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 849. P. 77.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90098-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90098-8)
26. Upchurch R.G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. P. 967.
<https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>
27. Markovskaya I.E.F., Gulyaeva E.N., Kosobryukhov A.A., Morozova K.V., Sergienko L.A. Structural and functional features of the leaves of the dominant plants in the tidal zone of the White Sea // Plant Archives. 2017. V. 17. P. 1685.
28. Huoto B., Yao J., Montgomery B.L., He S.Y. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness // Mol. Plant. 2014. V. 7. P. 1267.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
29. Марковская Е.Ф., Розенцвиг О.А., Шмакова Н.Ю., Зорина А.А., Ильинова М.А. Участие липидов в адаптации высших сосудистых растений к условиям Западного Шпицбергена // Журн. общ. биол. 2021. Т. 82. С. 419.
<https://doi.org/10.31857/S0044459621060063>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА И ОБЕЗВОЖИВАНИЯ НА УРОВЕНЬ ПОЛ И ДЫХАНИЕ ЗАРОДЫШЕЙ СЕМЯН ГОРОХА, РОСТ ПРОРОСТКОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ЭПИКОТИЛЕЙ

© 2024 г. И. П. Генерозова^{а,*}, С. В. Васильев^а, П. А. Буцанец^а, А. Г. Шугаев^а

^аФедеральное Государственное бюджетное учреждение науки

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

*e-mail: igenerozova@mail.ru

Поступила в редакцию 22.07.2023 г.

После доработки 11.08.2023 г.

Принята к публикации 14.08.2023 г.

Исследовали влияние предобработки 0.1 мкМ мелатонином и кратковременного обезвоживания набухающих семян на водный дефицит, уровень ПОЛ и дыхание зародышей, а также последующий рост эпикотилей проростков гороха (*Pisum sativum* L.) и окислительную активность выделенных из них митохондрий. Две группы зародышей одинакового возраста, но отличающихся по весу и по стадии развития исследовали отдельно: набухшие зародыши, но не прорвавшие оболочки семени (группа 1) и проклюнувшиеся зародыши (группа 2). Уровень водного дефицита зародышей 1 и 2 группы в отсутствие доступа воды повышался на 8.7 и 6.9% соответственно, что оказалось чувствительным для дыхательной активности зародышей. Было показано, что зародыши группы 2, прорвавшие оболочку семени и вступившие в контакт с кислородом воздуха, переживали резкий подъем дыхательной активности, который был сопряжен с повышением уровня ПОЛ, регистрируемого по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Кратковременное обезвоживание тормозило дыхание зародышей этой группы, связанное с активностью цитохромного пути, но не сопровождалось возникновением окислительного стресса, а напротив, снижало уровень ПОЛ. У набухших, но не прорвавших оболочку семени зародышей группы 1 также отсутствовал окислительный стресс при обезвоживании. Предобработка мелатонином существенно повышала активность цитохромного пути дыхания у обеих групп зародышей, как в контроле, так и у подвергнутых обезвоживанию семян. У митохондрий, выделенных из эпикотилей 5-дневных проростков, выросших из семян, предобработанных мелатонином и подвергнутых обезвоживанию, наблюдалась активация окисления НАД-зависимого субстрата (малата), как в контрольных, так и в стрессовых условиях. Также было показано, что предобработка мелатонином стимулировала рост эпикотилей проростков группы 2 во всех вариантах опытов, тогда как у проростков группы 1 только после действия обезвоживания. Сделан вывод, что предобработка семян мелатонином стимулировала процесс дыхания зародышей за счет активации цитохромного пути, а также активировала окисление малатами митохондриями эпикотилей проростков и действовала как стимулятор роста эпикотилей после обезвоживания. Впервые показано, что кратковременное обезвоживание тканей зародыша может не сопровождаться окислительным стрессом.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, дыхание зародышей, митохондрии, обработка семян мелатонином, обезвоживание семян, окислительный стресс, рост проростков, цитохромный и альтернативный путь дыхания

DOI: 10.31857/S0015330324010107, **EDN:** NVNEMG

ВВЕДЕНИЕ

Исследование последствий неблагоприятных воздействий на прорастающие семена имеет существенное значение для понимания процессов, лежащих в основе получения высокока-

чественного и обильного урожая. В последние годы показано, что время набухания семян и их прорастания является наиболее чувствительной и критичной стадией для развивающегося проростка и дальнейшего становления растения [1]. Этот период развития растения активно исследуется в последние годы: показана сигнальная природа регуляции прорастания семян, в которой ключевую роль играет взаимодействие гор-

Сокращения: АП – альтернативный путь дыхания, ВД – водный дефицит, ТБК-РП – продукты реакции с тиобарбитуровой кислотой, НФ – неблагоприятный абиотический фактор, СГК – салицилгидроксамовая кислота, ЦП – цитохромный путь дыхания.

монов АБА и гиббереллина при переходе растения из состояния покоя к прорастанию [2], а также изучается роль других гормонов, влияющих на восприятие семенами факторов внешней среды, на процессы пробуждения семени, активизации метаболизма, в частности, энергетического метаболизма, в первую очередь – в делящихся клетках зародыша.

Роль дыхательного метаболизма в поглощении воды у набухающих зародышей люпина исследовал Czosnowski [3], который показал зависимость между этими метаболическими процессами. Становление энергетики митохондрий в ходе биогенеза органелл в клетках прорастающих семян многие годы было предметом пристального внимания исследователей [4–6]. Поглощение кислорода тканями фиксировалось через несколько минут после поступления воды в отделенные зародыши люпина [3], семян гороха [7], семена растений [6, 8, 9]. При этом в лаборатории А. Pradet [8, 9] зафиксировали окислительное фосфорилирование сразу при набухании семени у всех из 12 исследованных видов растений. Ряд данных показывает, что восстановление структурной целостности и функциональной активности митохондрий семядолей гороха происходит в первые часы набухания семядолей. Лаг-фаза, продолжающаяся, по крайней мере, 1 ч [4, 5] сменяется за несколько часов набухания семян активным окислением сукцината митохондриями. Появление дыхательного контроля (ДК), равного 1.1, отмечено через 2 ч, а через 6 ч ДК равен 1.6, АДФ/О равно 0.81. Если семена салата замачивали в аэрируемой среде, как показано в работе [10], фосфорилирование начинается в течение первого часа набухания. У других семян биогенез митохондрий протекает более длительное время, что может объясняться, в частности, более плотной оболочкой семени и это отражается на поступлении воды и газообмене (например, у кукурузы) [6]. Прорастание завершается, когда растущий зародыш начинает контактировать с внешней средой – кислородом воздуха, в этот момент резко активизируется метаболизм, включая дыхание, и возрастет уровень АФК, ведущий к увеличению ПОЛ (ТБК-РП – пул соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) в тканях зародыша [11–14]. Детальное исследование, проведенное на семенах гороха, показало, что подъем уровня АФК происходит уже в начале набухания семян, а второй подъем выявлен в период выхода зародыша из оболочки семени и активизации метаболизма [15]. В норме выявленные повышения уровня АФК находятся под контролем антиоксидантной системы зародыша, и не воспринимаются растением как стрессовый фактор, в противном случае прорастание затрудняется и семя погибает [13, 14]. В последние годы все больше данных,

позволяющих предположить, что АФК играют основную регуляторную роль в процессах покоя и прорастания семян [14, 15, 16].

Воздействие на семена в этот чувствительный для растения период набухания и прорастания семени используется в последние годы для повышения сопротивляемости растений к неблагоприятным влияниям среды, для улучшения количества и качества урожая. Разработан метод “прайминга”, который кажется перспективным и широко изучается в последние годы, т.к. его применение дает положительные результаты. Он основан на предобработке семян осмотиками либо препаратами, оказывающими через сигнальную сеть положительный эффект на различные стороны метаболизма семян и развивающихся из них растений [2, 17]. Мелатонин также относится к сигнальным молекулам и, взаимодействуя с рядом фитогормонов, он включается в регуляцию процессов роста и развития растений. Обработка мелатонином семян ряда сельскохозяйственных культур оказывает положительный эффект, так предобработка 100 мкМ мелатонина семян огурца повысила скорость их прорастания, стимулировала генерацию корней, понизила деградацию хлорофилла в листьях, а также активировала ферменты антиоксидантной защиты [18]. Аналогичная обработка семян томатов повышала устойчивость корней к условиям обезвоживания, регулировала антиоксидантную систему и нивелировала повреждения ФС II листьев [19]. Предобработка семян лука-порея 5 мкМ мелатонина значительно повышала индекс прорастания семян при 7°C [20]. Предобработка семян хлопка 100 мкМ мелатонина повышала устойчивость к продолжительному обезвоживанию семян [16]. Также показана концентрационная зависимость эффекта при воздействии мелатонина – низкие концентрации не влияли либо влияли положительно, тогда как высокие концентрации гормона нередко подавляли прорастание семян [21, 22].

В то же время, в литературе встречается недостаточно работ, посвященных изучению влияния неблагоприятных факторов на метаболизм зародыша в период прорастания семени. Интересна работа [23], в которой исследовали влияние продолжительного обезвоживания набухающих семян гороха в течение 12–36 ч на дальнейшее восстановление структуры и функции митохондрий зародыша. Показано, что важным фактором при воздействии обезвоживания может оказаться не только продолжительность, но и время осуществления воздействия. Авторы пришли к заключению, что восстановление структуры и функции митохондрий гороха после неблагоприятного воздействия (обезвоживания) на набухающие семена имеет решающее значение для выживания семян после перенесенного стресса. Влияние предобработки семян антистрессовым

препаратом на проростки гороха и роль митохондриального метаболизма в поддержании стрессированных проростков нами было исследовано в предыдущей работе, в которой было показано, что предобработка семян гороха донором NO (натрий μ 2-дитиосульфато-тетра нитрозилфerratтетрагидратом – ТНКЖ-тио) предотвращала развитие окислительного стресса и снижала уровень ПОЛ у 5-дневных проростков после действия теплового шока на проростки гороха. Кроме того, обработка семян ТНКЖ-тио предотвращала стресс-индуцированные изменения в составе ЖК мембран митохондрий эпикотилей и поддерживала их энергетическую эффективность [24].

Целью настоящей работы явилось изучение потенциальной роли предобработки мелатонином семян гороха в предотвращении неблагоприятного действия обезвоживания на уровень ТБК-РП и дыхание отделенных зародышей, а также на рост этиолированных проростков и окислительную активность выделенных из них митохондрий. В отличие от предыдущих исследователей [16, 23], в настоящей работе мы воздействовали на зародыши непродолжительным обезвоживанием семян, учитывая, что в период активного насыщения зародышей водой они особенно чувствительны к прерыванию орошения [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали семена гороха сорта “Немчиновский 100”, полученные в институте ФГБНУ “Федеральный Исследовательский Центр “Немчиновка”. Опытные семена предобрабатывали в течение часа мелатонином (0.1 мкМ), контрольные выдерживали в дистиллированной воде, затем все семена проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной 50% раствором Хогланда. После 14 ч набухания половину семян переводили на сухую фильтровальную бумагу на 4 ч, после чего зародыши половины опытных и контрольных семян использовали для исследования, другую половину оставляли на проращивание на 5 сут. Учитывая имеющиеся в литературе данные о том, что при контакте с кислородом воздуха резко меняется метаболизм зародышей, в том числе дыхательный [26], мы разделили одновозрастные семена на 2 группы: с набухшими зародышами (группа 1) и семена, зародыши которых уже проклюнулись из оболочек семени (группа 2).

Для исследования дыхания зародыши отделяли от семени и помещали в ячейку кислородного электрода типа Кларка, содержащую среду инкубирования, в состав которой входил НЕРЕС-буфер (pH 7.25). Для определения общей скорости дыхания ($V_{\text{общ}}$), скорости альтернативного цианид-резистентного ($V_{\text{альт}}$) и остаточного

($V_{\text{ост}}$) дыхания ткани применяли ингибиторный анализ с использованием цианида калия (KCN, 2 мМ) и салицилгидроксамовой кислоты (СГК, 5 мМ). Оптимальные концентрации ингибиторов, достаточные для полного подавления соответствующих оксидаз, были определены в предварительных опытах. Активность цитохромного пути митохондриального окисления (ЦП или $V_{\text{цит}}$) определяли по степени чувствительности дыхания ткани к цианиду, а максимальную активность альтернативного пути митохондриального окисления (АП или $V_{\text{альт}}$) определяли по степени чувствительности дыхания ткани к СГК в присутствии KCN. Остаточное дыхание ткани ($V_{\text{ост}}$) измеряли по скорости поглощения кислорода тканью в присутствии KCN и СГК [27].

Выделение митохондрий из эпикотилей 5-дневных проростков, выросших из контрольных и подвергнутых действию обезвоживания и обработке мелатонином семян (семена при этом не делили на группы) осуществляли, используя единую методику дифференциального центрифугирования [28]. Этапы центрифугирования проводили на высокоскоростной центрифуге с охлаждением HITACHI CR22 G-III (“Hitachi”, Япония) при 4С. Навеску растительного материала измельчали со средой гомогенизации в соотношении 1:4 веса ткани (г) к объему среды гомогенизации (мл) которая содержала: 0.4 М сахарозу, 20 мМ НЕРЕС-буфер (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Гомогенат фильтровали через 4 слоя мираклоза и центрифугировали при 15000 g 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде отмывания, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ НЕРЕС-буфер (pH 7.4), 10 мМ ЭДТА, 0.2% БСА, свободный от ЖК и центрифугировали 5 мин при 4000 g. Отделяли супернатант и центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Осадок митохондрий, содержащий около 5 мг/мл белка, ресуспендировали в 1 мл среды, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ НЕРЕС-буфер (pH 7.2) и 0.1% БСА, свободный от ЖК и хранили при 0°C.

Поглощение кислорода митохондриями измеряли полярографически с использованием кислородного электрода типа Кларка. Стандартная инкубационная среда (1 мл) содержала: 0.4 М сахарозу, 20 мМ НЕРЕС-буфер (pH 7.4), 5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4) и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Дополнительно, в среду инкубации добавляли дыхательные субстраты – 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата, 10 мМ сукцинат, а также 100 или 200 мкМ АДФ. Содержание белка митохондрий определяли по методу Бредфорда с БСА в качестве стандарта.

Активность различных путей митохондриального окисления определяли с использованием ингибиторного анализа. Активность ЦП определяли по степени ингибирования окис-

ления субстратов митохондриями в состоянии 3 в присутствии 2 мМ KCN. Максимальную активность цианид-резистентного АП митохондриального окисления определяли по степени ингибирования окисления субстратов после добавки 2 мМ СГК в присутствии цианида. Оптимальные концентрации ингибиторов были подобраны в ходе предварительных экспериментов путем титрования.

Водный дефицит тканей зародышей гороха определяли в соответствии со следующей формулой [29]:

$$\text{Водный дефицит} = \frac{\text{тургесцентный вес} - \text{начальный вес}}{\text{тургесцентный вес} - \text{сухой вес}} \times 100.$$

Содержание ТБК-РП в зародышах определяли по методу [30]. Навеску ткани (1 г) гомогенизировали с 25 мл водно-этанольного раствора в пропорции 20/80, затем пробы центрифугировали при 3000 g 10 мин. Далее 1 мл аликвоты добавляли в пробирки, содержавшие 20% ТХУ (–ТБК раствор) или содержавшие в дополнение к ТХУ, 65% ТБК (+ТБК раствор). Образцы выдерживали на водяной бане при температуре 95°C в течение 30 мин, немедленно охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Интенсивность окрашивания супернатанта определяли на спектрофотометре Genesis 10uv при трех длинах волн (440, 532 и 600 нм). Содержание ТБК-РП определяли, используя следующий алгоритм расчета:

$$1. (A_{532(+)}\text{ТБК} - A_{600(+)}\text{ТБК}) - (A_{532(-)}\text{ТБК} - A_{600(-)}\text{ТБК}) = A,$$

$$2. (A_{440(+)}\text{ТБК} - A_{600(+)}\text{ТБК}) \times 0.0571 = B,$$

$$3. \text{ТБК-РП (нмоль/мл)} = [(A - B) \times 157000] \times 10^6.$$

Для исследования длины эпикотилей этиолированных проростков, семена контрольные и подвергнутые предобработке 0.1 мкМ мелатонином и обезвоживанию, разделяли на 8 вариантов – контрольные, предобработанные мелатонином, подвергнутые обезвоживанию и предобработанные мелатонином и прошедшие обезвоживание, внутри указанных групп семена делили на проросшие – прорвавшие оболочку семени и семена с набухшим зародышем. Все 8 групп выращивали отдельно на фильтровальной бумаге на 50% растворе Хогланда. Измерение длины эпикотиля проводили через 5 сут с помощью линейки с нониусом.

В таблицах и на графиках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. В работе приведены данные опытов, имеющих 3–5 – кратную биологическую повторность. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние обезвоживания и предобработки мелатонином на водный дефицит тканей зародышей

У зародышей из набухших семян (группа 1) водный дефицит в контроле был невысоким – 8%, у зародышей из проклюнувшихся семян (группа 2) – 11%, что соответствует норме у травянистых растений. Обезвоживание стимулировало водный дефицит у обеих групп зародышей до 17–18% (рис. 1). Предобработка мелатонином не влияла на водный дефицит в контроле у зародышей 2 группы, тогда как у 1 группы этот показатель возрастал почти в 3 раза, достигая 21%. В варианте с предобработкой мелатонином обезвоженных семян, водный дефицит в тканях зародышей достигал самых высоких значений для обеих групп семян – 22% для первой группы и 24% для второй. Можно предположить, что мелатонин стимулировал накопление метаболитов, способствуя повышению водного дефицита тканей зародыша (рис. 1).

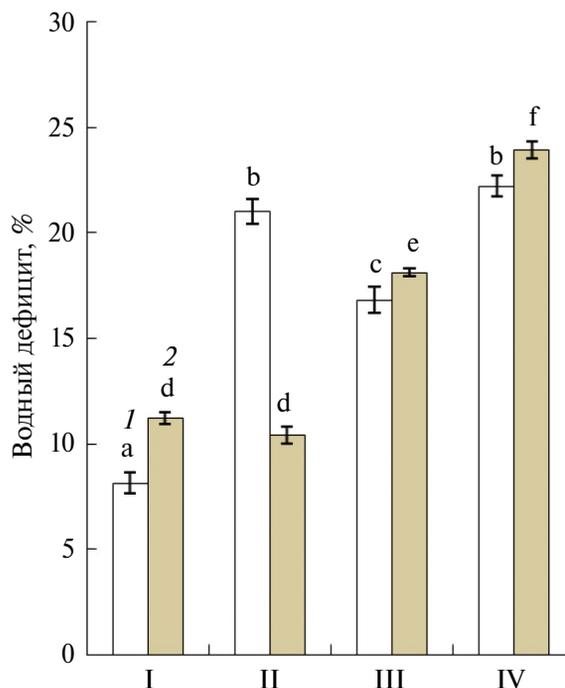


Рис. 1. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на водный дефицит тканей зародышей группы 1 (1) и группы 2 (2) 18-часовых семян гороха. Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

Влияние предобработки мелатонином и обезвоживания семян на содержание ТБК-РП в зародышах

Судя по полученным результатам, у зародышей из семян группы 1, содержание ТБК-РП в контроле и в условиях обезвоживания было примерно одинаково. Т.е. у этих зародышей действие НФ, по-видимому, не создавало условий для возникновения окислительного стресса. Однако предобработка мелатонином снижала уровень ТБК-РП у зародышей в контрольных семенах на 70%, а в семенах подвергнутых действию обезвоживания – на 50% (рис. 2). Содержание ТБК-РП в зародышах семян группы 2 в контроле было намного выше, чем в зародышах группы 1, а также выше, чем при обезвоживании на 58%. Предобработка семян мелатонином снизила содержание ТБК-РП у этих зародышей в контроле на 63%, в условиях обезвоживания – на 21%. При этом, у зародышей из семян группы 2 содержание ТБК-РП во всех вариантах было выше по сравнению с не проклюнувшимися зародышами (рис. 2).

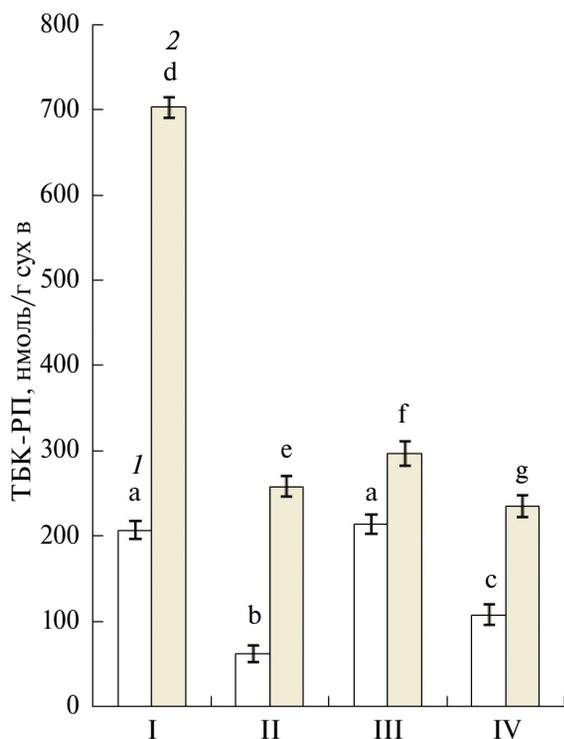


Рис. 2. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на содержание ТБК-РП в тканях зародышей группы 1 (I) и группы 2 (II) 18-часовых семян гороха. Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

Влияние обезвоживания и предобработки мелатонином на дыхание зародышей

Дыхание отделенных зародышей из семян группы 1 в контрольном варианте осуществлялось преимущественно по цитохромному пути (ЦП), составляющему 52% от общей скорости поглощения кислорода зародышами ($V_{\text{общ}}$), тогда как максимальная активность альтернативного пути (АП) дыхания составляла только 17% (рис. 3). Предобработка семян этой группы мелатонином стимулировала $V_{\text{общ}}$ на 29%, при этом активность ЦП также существенно увеличивалась (на 87%) на фоне заметного снижения активности АП (на 77%). Отношение различных путей дыхания также увеличивалось в пользу ЦП, как за счет снижения активности АП, так и скорости остаточного дыхания ($V_{\text{ост}}$). Обезвоживание стимулировало общую скорость дыхания зародышей, а также активность ЦП и АП по сравнению с контролем соответственно на 10.6, 39.7 и 41.6%. Предобработка семян мелатонином в варианте IV (мелатонин + обезвоживание) стимулировала $V_{\text{общ}}$, а также

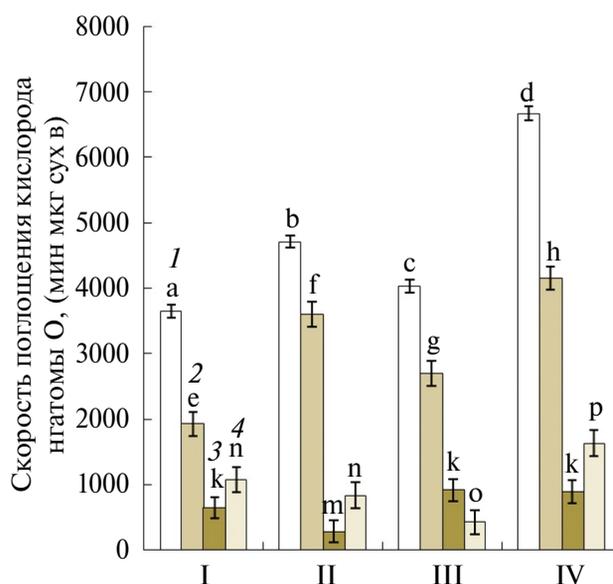


Рис. 3. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на скорость поглощения кислорода зародышами группы 1 18-часовых семян: (1) – скорость поглощения кислорода зародышами ($V_{\text{общ}}$); (2) – активность цитохромного пути дыхания; (3) – максимальная активность альтернативного пути дыхания; (4) – остаточное дыхание. Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, относящиеся к соответствующему субстрату (1 или 2), отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

существенно активировала ЦП по сравнению с вариантом III (обезвоживание) соответственно на 65.4 и 54% (рис. 3). Таким образом, отношение различных путей дыхания зародышей под влиянием обезвоживания набухающих семян возросло в пользу АП за счет снижения скорости остаточного дыхания.

Поглощение кислорода тканью отделенных зародышей семян группы 2 характеризовалось достаточно высокой чувствительностью к ингибитору цитохромоксидазы (цианиду), что указывало на преобладание ЦП дыхания. При этом предобработка семян мелатонином стимулировала дальнейшее увеличение активности ЦП на 39%, и в то же время снижала активность АП на 39% (рис. 4). Обезвоживание существенно тормозило интенсивность дыхания ($V_{\text{общ}}$) зародышей группы 2, при этом активность ЦП снижалась на 21%, одновременно максимальная активность АП повышалась на 32% по сравнению с контрольными растениями (рис. 4). Важно отметить, что предобработка семян мелатонином существенно (почти в два

раза) повышала активность ЦП дыхания в варианте IV (мелатонин + обезвоживание). Также заметно возрастала интенсивность дыхания ткани и уровень остаточного дыхания (рис. 4). Таким образом, предобработка семян мелатонином предотвращала ингибирование дыхания зародышей 2 группы под влиянием обезвоживания благодаря существенной активации ЦП дыхания даже по сравнению с контрольным вариантом. В целом, характеризуя влияние мелатонина на дыхание зародышей, следует отметить, что обработка гормоном у обеих групп зародышей, как в контрольных, так и в неблагоприятных условиях, “сдвигала” отношение между ЦП и АП в сторону первого, т.е. в сторону энергопоставляющей функции дыхательного метаболизма, что могло способствовать ускоренному росту проростков.

*Влияние обезвоживания
и обработки мелатонином на рост проростков
и дыхание выделенных из эпикотилей
митохондрий*

Целью исследования роста проростков и дыхания митохондрий, выделенных из эпикотилей 5-дневных проростков, было проверить возможность сохранения показанного выше эффекта предобработки мелатонином и краткосрочного обезвоживания семян на физиологические показатели не только у зародышей, но и у проростков, т.е. на более позднем этапе развития растений.

Результаты показали, что предобработка семян стимулировала рост эпикотилей 5-дневных проростков как в контрольных условиях, так и в варианте с обезвоживанием семян группы 2, у семян группы 1 – рост эпикотилей стимулировался только в условиях обезвоживания (рис. 5). При этом у семян группы 2 обезвоживание незначительно понижало длину эпикотилей, но стимуляция роста предобработкой мелатонином была более значительная, чем в контрольном варианте на 22 и 11.6% соответственно. У проростков группы 1 мелатонин вызывал снижение активности скорости роста эпикотилей в контрольном варианте. Обезвоживание значительно стимулировало рост отстающих в развитии проростков, в результате обе группы проростков почти сравнялись в размерах эпикотилей. Можно отметить, что обезвоживание послужило фактором синхронизации ростовых процессов, тогда как предобработка мелатонином семян вызвала, напротив, рассинхронизацию роста отстающих в развитии и продвинутых проростков исследуемых групп (рис. 5). В целом, обработка семян мелатонином оказывала существенное активирующее действие на рост эпикотилей проростков гороха.

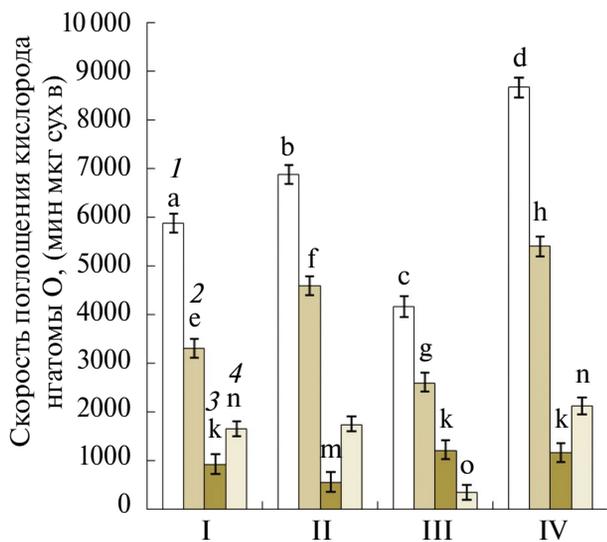


Рис. 4. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на скорость поглощения кислорода зародышами группы 2 18-часовых семян: (1) – скорость поглощения кислорода зародышами ($V_{\text{общ}}$); (2) – активность цитохромного пути дыхания; (3) – максимальная активность альтернативного пути дыхания; (4) – остаточное дыхание. Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, относящиеся к соответствующему субстрату (1 или 2), отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

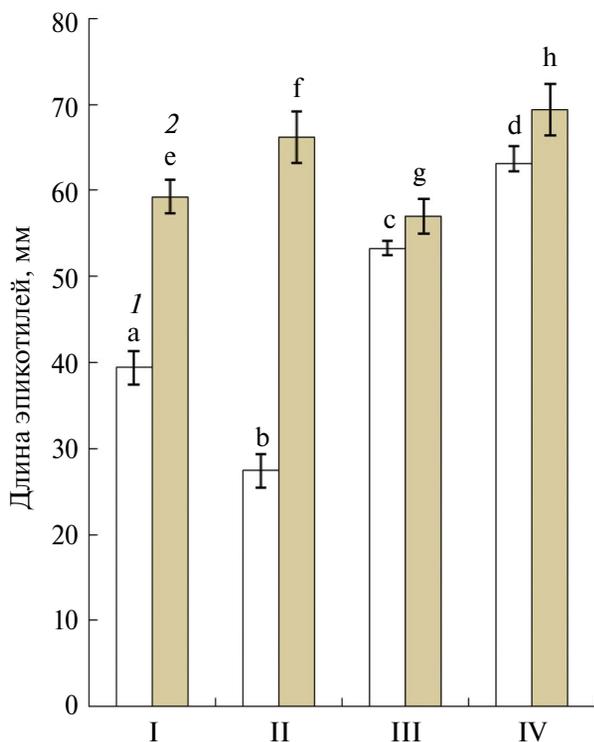


Рис. 5. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на длину эпикотилей 5-дневных проростков гороха, выросших из семян зародышей группы 1 (1) и зародышей группы 2 (2). Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

Влияние предобработки мелатонином и обезвоживания семян на окислительную активность митохондрий, выделенных из эпикотилей 5-дневных проростков

Полученные результаты показали, что обезвоживание и предобработка семян гороха мелатонином по-разному отражались на окислении митохондриями малата и сукцината. Так, при окислении НАД-зависимого субстрата предобработка семян мелатонином в контрольном варианте увеличивала скорость поглощения кислорода митохондриями в состоянии 3 (V_3) более чем в 2 раза, преимущественно за счет увеличения активности ЦП ($V_{цит}$) (рис. 6а). Несколько иная картина наблюдалась при окислении митохондриями янтарной кислоты. Митохондрии, выделенные из эпикотилей 5-дневных контрольных проростков гороха, характеризовались высокой скоростью окисления сукцината в состоянии 3, которая была вдвое выше аналогичной скорости окисления малата. Предобра-

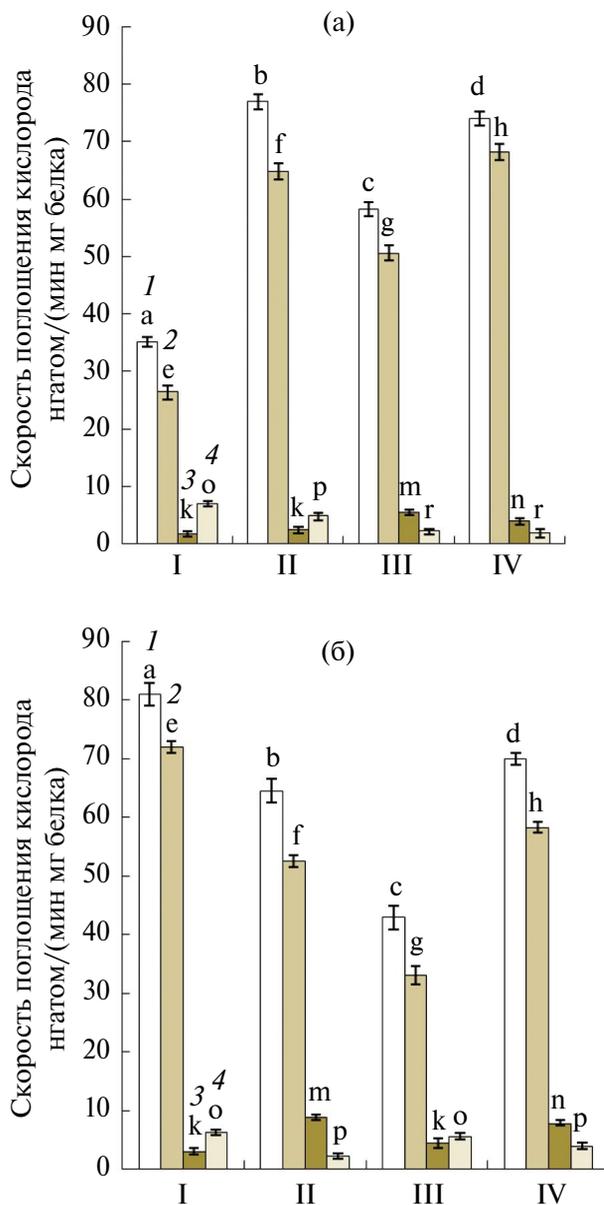


Рис. 6. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на дыхание и активность различных путей окисления малата (а) и сукцината (б) митохондриями эпикотилей 5-дневных проростков гороха: (1) – скорость окисления субстратов в состоянии 3 (V_3); (2) – скорость окисления субстратов по цитохромному пути ($V_{цит}$); (3) – скорость окисления субстратов по альтернативному пути ($V_{альт}$); (4) – скорость остаточного дыхания ($V_{ост}$). Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, относящиеся к соответствующему субстрату (1 или 2), отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

ботка семян мелатонином или не оказывала заметного влияния или незначительно снижала (максимально на 20–25%) скорость окисления этого субстрата митохондриями. В то же время, обезвоживание набухающих семян существенно (на 47%) тормозило V_3 при окислении сукцината в митохондриях эпикотилей. В этом варианте, предобработка семян мелатонином увеличивала скорость окисления сукцината митохондриями в состоянии 3 (на 63%) и активность ЦП (на 77%), т.е. поддерживала окисление этого субстрата ближе к уровню контроля (рис. 6б). Таким образом, действие НФ (в данном случае обезвоживания), а также предобработки мелатонином, на набухающие семена гороха, существенным образом сказывалось не только на дыхании зародышей этих семян, но и на окислительной активности митохондрий, выделенных на более поздней стадии развития проростков.

ОБСУЖДЕНИЕ

Особенность набухающих семян состоит в том, что они переходят от сухого состояния к оводненному и этот процесс сопровождается восстановлением метаболизма, в первую очередь дыхательного, необходимого для поддержания энергопотребляющих процессов. Параллельно активируется рост зародышей и развитие проростков, что приводит к становлению растения. Отмечено, что набухающие зародыши проходят через определенные периоды – фазы развития, которые характеризуются изменениями в активности поглощения воды, направленности и интенсивности метаболизма, а также в содержании АФК и состоянии антиоксидантной системы [2, 26]. У *Pisum sativum* начало набухания семян сопровождалось немедленным, но быстро проходящим всплеском экстраклеточной редокс-активности, включающей повышение уровня супероксида и перекиси водорода в тканях [15]. На финальной стадии прорастания, параллельно с ростом зародыша и его выходом из оболочек семени, происходил второй подъем АФК – продуцировался супероксид, но не перекись водорода, а также активировалась экстраклеточная пероксидаза. Полученные нами результаты соответствуют данным о стимуляции метаболизма зародышей в период перехода от замкнутого состояния в семени к контакту с воздухом [15], и одновременно о подъеме уровня АФК в тканях зародышей [14]. Мы также показали, что в этот период возрастал уровень ПОЛ (тестируемый по образованию ТБК-РП) в контрольном варианте у зародышей группы 2, но не у более мелких зародышей группы 1, отстающих в своем развитии (рис. 2).

У более мелких зародышей обезвоживание не снижало уровень ТБК-РП, но и не повышало

его, как и не влияло на общую скорость дыхания ($V_{общ}$), т.е. они по этим показателям не реагировали на обезвоживание. При этом, мелкие зародыши, как и более продвинутые в развитии, возможно, сохранили защитные механизмы, позволяющие им благополучно продолжать рост в условиях обезвоживания. Например, стрессовые белки SHP22, или Lea – белки PsLEAm, которые накапливаются в матриксе митохондрий сухих семян, были обнаружены и у 72-дневных проростков бобовых [31, 32].

Полученные результаты показали также, что реакция дыхания зародышей на предобработку мелатонином у контрольных семян сводится к заметному повышению активности ЦП и некоторому подавлению активности АП у обеих групп зародышей. В результате скорость поглощения кислорода зародышами обеих групп возрастала. Кроме того, была обнаружена примерно одинаковая реакция зародышей обеих групп предобработанных мелатонином семян на обезвоживание – активность ЦП была в 1.6 (или 2 раза) выше у зародышей 2 группы и в 2.2 (или 1.5 раза) выше у более мелких зародышей группы 1 по сравнению с контролем и обезвоживанием соответственно (рис. 3, 4). Судя по этим данным, мелатонин поддерживал активность ЦП в условиях действия НФ даже у более продвинутых в развитии зародышей, у которых дыхание было дополнительно активировано вследствие контакта с кислородом воздуха.

Предобработка мелатонином во всех случаях снижала уровень ТБК-РП в ткани зародышей, но у более мелких снижение ТБК-РП в условиях обезвоживания было менее значительное, чем в контроле (рис. 2). Это подтверждает предположение об отсутствии кислородного стресса у зародышей в условиях обезвоживания семян. При этом надо иметь в виду, что увеличение водного дефицита зародышей за период 4-часового отсутствия влаги составляло 9–7%, это величина, на которую реагировало дыхание (в частности, заметным снижением общей скорости дыхания зародышей 2 группы), но окислительного стресса при этом не возникало.

Результаты наших исследований показали, что во время выхода зародышей из оболочек семени значительно стимулировалось дыхание, при этом скорость поглощения кислорода этими зародышами возрастала в 1.6 раза, активность ЦП увеличилась в 1.7 раза, а АП – в 1.4 раза (рис. 4). Судя по нашим данным, у более крупных зародышей группы 2 рост дыхательной активности в случае контакта с кислородом воздуха был нивелирован обезвоживанием, однако, у более мелких зародышей обезвоживание, напротив, стимулировало активность ЦП и АП. Противоположная реакция на обезвоживание является характерным

отличием зародышей двух исследуемых групп семян. Она свидетельствует, по-видимому, об их разном физиологическом состоянии: у более продвинутых в развитии семян обезвоживание тормозит отмеченное активирование метаболизма зародышей, которое может быть опасным в отсутствие достаточного водоснабжения. Это делает вторичную потерю воды семенами не столь опасной для метаболизма зародышей, а напротив, переводит семена в состояние, при котором они безопасно могли бы существовать в течение длительного периода. Снижение уровня ТБК-РП в зародышах в условиях обезвоживания подтверждает это предположение, которое, тем не менее, нуждается в дополнительном исследовании.

Сопоставляя дыхание митохондрий эпикотилей с дыханием отделенных зародышей видно, что окисление малата митохондриями более всего совпадает с соответствующей реакцией дыхания зародышей группы 1 на предобработку семян мелатонином и их обезвоживание. В частности, обработка гормоном существенно стимулировала дыхание зародышей и скорость поглощения кислорода при окислении малата митохондриями в состоянии 3, преимущественно за счет активации ЦП, как в контроле, так и при действии НФ (рис. 3, 6). Можно предположить, что по мере набухания и развития зародышей основными, наиболее активно окисляемыми субстратами в митохондриях мог быть именно малат и другие НАД-зависимые субстраты. Физиологически такой вывод обоснован, т.к. комплекс I энергетически наиболее эффективен, и он обеспечивает максимально возможное субстратное и энергетическое обеспечение развивающихся зародышей, например, зародышей кукурузы [6]. Sew с соавт. [33] пришли к выводу о важной роли малатдегидрогеназы на ранних фазах жизненного цикла *A. thaliana* в период прорастания семян и роста проростков. Это не противоречит тому факту, что на более позднем этапе развития проростков растений, включая проростки гороха, основным субстратом митохондриального окисления может стать уже другой субстрат – сукцинат, на окисление которого предобработка семян мелатонином сказывалась только после действия НФ (рис. 6б). Можно предположить, что у зародышей скорость окисления субстратов комплекса I митохондриями также активировалась предобработкой мелатонином и эффект был выше при обезвоживании. Однако эти предположения требуют экспериментальной проверки.

Возникает вопрос, как отражается воздействие предобработки мелатонином и непродолжительного обезвоживания семян на рост эпикотилей? Наши результаты показали,

что предобработка мелатонином достоверно стимулировала рост эпикотилей у семян группы 2, характеризующихся высокой всхожестью, причем в неблагоприятных условиях не менее эффективно, чем в контроле (рис. 5). Это свидетельствует о положительном влиянии предобработки 0.1 мкМ мелатонином семян гороха на рост и дыхательный метаболизм проростков.

Таким образом, полученные результаты подтвердили, что у зародышей гороха в период перехода от набухания в семени к контакту с кислородом воздуха значительно активируется дыхательный метаболизм, о чем свидетельствует стимуляция энергетически значимого цитохромного пути митохондриального окисления. Также мы подтвердили, что в это время повышается уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), тестируемый по уровню ТБК-РП в тканях зародышей семян гороха. Полученные в работе результаты свидетельствуют о высокой чувствительности к 4-часовому обезвоживанию семян растущих проростков, а также об эффективности предобработки семян 0.1 мкМ мелатонином в поддержании роста и дыхательного метаболизма зародышей и проростков, как в нормальных условиях, так и в условиях неблагоприятного воздействия. Впервые показано, что обработка семян гороха мелатонином существенно стимулировала рост эпикотилей проростков, а также активировала окисление малата изолированными из них митохондриями, как в контрольных условиях, так и после кратковременного обезвоживания. Также впервые показано, что обезвоживание тканей зародыша может не сопровождаться окислительным стрессом.

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. Aflaki F., Sedghi M., Pazuki A., Pessarakli M. Investigation of seed germination indices for early selection of salinity tolerant genotypes: A case study in wheat // Emirates J. Food and Agricult. 2017. V. 29. P. 222. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-12-1940>

2. *Farooq M.A., Ma W., Shen S., Gu A.* Underlying biochemical and molecular mechanisms for seed germination // *IJMS*. 2022. V. 23. P. 8502. <https://doi.org/10.3390/ijms23158502>
3. *Czosnowski J.* Metabolism of excised embryos of *Lupinus luteus* L. Effect of metabolic inhibitors and growth substances on the water uptake // *Acta Soc. Bot. Pol.* 1962. V. 31. P. 135.
4. *Nawa Y., Asahi T.* Rapid development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination // *Plant Physiol.* 1971. V. 48. P. 671. <https://doi.org/10.1104/pp.48.6.671>
5. *Sato S., Asahi T.* Biochemical properties of mitochondrial membrane from dry pea seeds and changes in properties during imbibition // *Plant Physiol.* 1975. V. 58. P. 816.
6. *Logan D.C., Millar A.H., Sweetlove L.J., Hill S.A., Leaver C.J.* Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 662.
7. *Nawa Y., Asahi T.* Relationship between the water content of pea cotyledons and mitochondrial development during the early stage of germination // *Plant Cell Physiol.* 1973. V. 14. P. 607.
8. *Raymond P., Al-Ani A., Pradet A.* ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds // *Plant Physiol.* 1985. V. 79. P. 879.
9. *Al-Ani A., Bruzau F., Raymond P., Saint-Ges V., Leblanc J.M., Pradet A.* Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures // *Plant Physiol.* 1985. V. 79. P. 885.
10. *Hourmant A., Pradet A.* Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibition // *Plant Physiol.* 1981. V. 68. P. 631. <https://doi.org/10.1104/pp.68.3.631>
11. *Leprince O., van der Werf A., Deltour R., Lambers H.* Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars // *Physiol. Plant.* 1992. V. 85. P. 581.
12. *Leprince O., Atherton N.M., Deltour R., Hendry C.A.F.* The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. // *Plant Physiol.* 1994. V. 104. P. 1333.
13. *Bailly C.* Active oxygen species and antioxidants in seed biology // *Seed Sci. Res.* 2004. V. 14. P. 93. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>
14. *Bailly C.* The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy // *Biochem. J.* 2019. V. 476. P. 3019. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190159>
15. *Kranner I., Roach T., Beckett R.P., Whitaker C., Minibayeva F.V.* Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum* // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 805. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.01.019>
16. *Bai Y., Xiao S., Zhang Z., Zhang Y., Sun H., Zhang K., Wang X., Bai Z., Li C., Liu L.* Melatonin improves the germination rate of cotton seeds under drought stress by opening pores in the seed coat // *Peer J.* 2020. 8:e9450. <https://doi.org/10.7717/peerj.9450>
17. *Farooq M., Wahid A., Ahmad N., Asad S.A.* Comparative efficacy of surface drying and re-drying seed priming in rice: changes in emergence, seedling growth and associated metabolic events // *Paddy Water Environ.* 2010. V. 8. P. 15. <https://doi.org/10.1007/s10333-009-0170-1>
18. *Zhang N., Zhao B., Zhang H.J., Weeda S., Yang C., Yang Z.C., Ren S., Guo Y.D.* Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *J. Pineal Res.* 2013. V. 54. P. 15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01015.x>
19. *Liu J., Wang W., Wang L., Sun Y.* Exogenous melatonin improves seedling health index and drought tolerance in tomato // *Plant Growth Regul.* 2015. V. 77. P. 317. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0066-6>
20. *Hankl F., Çingi M., Akinkl H.* Influence of l-tryptophan and melatonin on germination of onion and leek seeds at different temperatures // *Turk. J. Agric. Res.* 2019. V. 6. P. 214.
21. *Hernandez I.G., Gomez F.V., Cerutti S., Arana M.V., Silva M.F.* Melatonin in *Arabidopsis thaliana* acts as plant growth regulator at low concentrations and preserves seed viability at high concentrations // *Plant Physiol. Biochem.* 2015. V. 94. P. 191. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.011>
22. *Lv Y., Pan J., Wang H., Reiter R.J., Li X., Mou Z., Zhang J., Yao Z., Zhao D., Yu D.* Melatonin inhibits seed germination by crosstalk with abscisic acid, gibberellin, and auxin in *Arabidopsis* // *J. Pineal Res.* 2021. V. 70. P. 1. <https://doi.org/10.1111/jpi.12736>
23. *Wang W.Q., Cheng H.-Y., Moller I.M., Song S.-Q.* The role of recovery of mitochondrial structure and function in desiccation tolerance of pea seeds // *Phys. Plant.* 2012. V. 144. P. 20. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01518.x>
24. *Zhigacheva I.V., Binyukov V.I., Generozova I.P., Mil E.M., Krikunova N.I., Rasulov M.M., Albantova A.A.* Sodium 2-dithiosulphate-tetranitrosyl diferate tetrahydrate prevents heat shock-induced mitochondria dysfunction // *Rus. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 198. <https://doi.org/10.1134/S1021443722010228>
25. *Li Y., Wang Y., Xue H., Pritchard H.W., Wang X.* Changes in the mitochondrial protein profile due to ROS eruption during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds // *Plant Physiol. Biochem.* 2017. V. 114. P. 72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.02.023>
26. *El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C.* Oxidative signaling in seed germination and dormancy // *Plant Sign. Behav.* 2008. V. 3. P. 175.

27. McDonald A.E., Sieger S.M., Vanlerberhe G.C. Methods and approaches to study plant mitochondrial oxidase // *Physiol. Plant.* 2002. V. 116. P. 135.
28. Generozova I.P., Vasilyev S.V., Butsanets P.A., Shugaev A.G. Combined action of melatonin and water deficiency on growth and MDA content of hypocotyls and roots of lupine and respiration of mitochondria isolated from these organs // *Russ J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 93.
<https://doi.org/10.1134/S1021443722050077>
29. Schmitt N., Dizengremel P. Effect of osmotic stress on mitochondria isolated from etiolated mung bean and sorghum seedlings // *Plant Physiol. Biochem.* 1989. V. 27. P. 1.
30. Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // *Planta.* 1999. V. 207. P. 604.
31. Grelet J., Benamar A., Teyssier E., Avelang-Macherel M.H., Grunwald D., Macherel D. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying // *Plant Physiol.* 2005. V. 137. P. 157.
32. Tolleter D., Jaquinod M., Mangavel C., Passirani C., Saulnier P., Manon S., Teyssier E., Patet N., Avelang-Macherel M.-H., Macherel D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 1580.
33. Sew Y.S., Ströher E., Fenske R., Millar A.H. Loss of mitochondrial malate dehydrogenase activity alters seed metabolism impairing seed maturation and post-germination growth in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2016. V. 171. P. 849.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01654>

УДК 581.1

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ *Sisymbrium lipskyi* К ЦИНКУ И ИХ ФИТОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

© 2024 г. И. В. Дроздова^{a, *}, И. Б. Калимова^a, А. И. Беляева^a, Г. А. Пожванов^{a, b, c},
Н. В. Алексеева-Попова^a

^aБотанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

^bСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

^cРоссийский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: IDrozdova@binran.ru

Поступила в редакцию 16.06.2023 г.

После доработки 10.07.2023 г.

Принята к публикации 10.07.2023 г.

Изучено влияние повышенных концентраций цинка на рост, минеральный состав, содержание хлорофиллов и каротиноидов у северокавказского вида гулявника Липского *Sisymbrium lipskyi* N. Busch. Растения выращивали в песчаной культуре в присутствии 80, 160 и 320 мг Zn/кг субстрата. Показана относительно высокая устойчивость *S. lipskyi* к токсическому действию цинка при дозах 80 и 160 мг/кг, проявляющаяся в отсутствии значимого уменьшения накопления сухой биомассы, достоверных изменений в содержании и соотношении хлорофиллов (*a/b*) и сохранении водного статуса. Существенное ингибирующее воздействие цинка на рост и развитие сеянцев наблюдалось лишь при его концентрации 320 мг/кг субстрата и сопровождалось значимым снижением биомассы и содержания хлорофилла *b*. Обнаружено нарушение баланса минеральных элементов, связанное в значительной степени со снижением транслокации элементов из корней в надземные органы сеянцев. Преимущественное накопление цинка в корневой системе (за исключением варианта 320 мг) характеризует *S. lipskyi* как вид, способный ограничивать поступление цинка в надземные органы, о чем свидетельствуют низкие значения величины фактора транслокации. Эта особенность минерального обмена, наряду с относительно высокой устойчивостью к цинку, позволяет рассматривать *S. lipskyi* как перспективный вид для фитостабилизации почв при средних уровнях загрязнения.

Ключевые слова: *Sisymbrium lipskyi*, аккумуляция, минеральные элементы, пигменты, токсичность, устойчивость, фиторемедиация, цинк

DOI: 10.31857/S0015330324010121, EDN: NVHTRS

ВВЕДЕНИЕ

Повышенные концентрации потенциально токсичных элементов-металлов в почве возникают в районах естественного обогащения подстилающих горных пород или вследствие антропогенной деятельности и могут оказывать токсическое действие на растения. В последние десятилетия из-за роста объемов их добычи, резкого увеличения количества автотранспортных средств, возрастания количества вносимых в почву минеральных удобрений значительно усилилось загрязнение окружающей среды. Металлы занимают особое положение среди других загрязняющих веществ, поскольку имеют способность накапливаться в верхнем горизонте почв и в течение долгого периода остаются доступными для поглощения растениями, тем самым включаясь в процессы миграции по трофическим цепям. Так, баланс Zn в поверхностном

слое почв в различных экосистемах показывает, что атмосферное поступление этого металла превышает его вынос за счет выщелачивания в 2–4 раза [1]. Цинк является одним из наиболее биологически доступных элементов в почве, а с ростом его концентрации отмечается значительное увеличение уровня подвижных соединений металла, в результате чего возрастает опасность загрязнения почв и сопредельных сред [2]. В малых количествах Zn является необходимым для растений элементом минерального питания, т.к. входит в состав ряда ферментов из всех известных групп в качестве интегрального компонента, но в избыточных концентрациях он становится токсичным. Наиболее общими симптомами токсического действия Zn являются замедление роста и развития растений, снижение темпов накопления биомассы, сопровождающиеся хлорозом ассимилирующих органов вследствие на-

рушения абсорбции, транспорта и утилизации необходимых питательных веществ [3].

Чувствительность видов по отношению к избытку Zn неодинакова. В целом, симптомы его токсичности проявляются при достаточно высоком содержании в растении – больше 200 мг/кг [4], по другим данным – больше 300 мг/кг [5]. Растения, способные без ущерба для своей жизнедеятельности аккумулировать в надземной части более 3000 мг Zn/кг сухой массы относят к гипераккумуляторам этого элемента. Больше всего гипераккумуляторов, более 20 видов, найдено среди представителей сем. *Brassicaceae* [6]. Феномен гипераккумуляции привлекает усиленное внимание в связи с перспективностью использования таких видов для фитоэкстракции избытка металлов из почв с их повышенным содержанием. Наряду с изучением видов-гипераккумуляторов во многих странах проводятся исследования фиторемедиационного потенциала обычных видов местной флоры, адаптированных к металлофитным местообитаниям [7, 8]. Многие из этих видов, уступающая гипераккумуляторам по уровню накопления металлов, превосходят их по количеству производимой биомассы и могут быть успешно использованы в природоохранных технологиях, таких как фитостабилизация, фитоэкстракция, а также для целей фитомайнинга [9]. Наиболее эффективные с точки зрения аккумуляционного потенциала металлоустойчивые растения могут использоваться как непосредственно для целей фиторемедиации, так и косвенно: в качестве источников генов для усиления аккумулирующих способностей и устойчивости других видов [10].

В настоящее время для территории Северного Кавказа имеется очень мало данных о видах природной флоры, которые могут быть использованы в области фиторемедиации территорий, загрязненных металлами. Наши предыдущие исследования аккумулирующей способности представителей сем. *Brassicaceae*, произрастающих в этом регионе на почвах, обогащенных потенциально токсичными элементами: Cd, Cu, Co, Ni, Pb и Zn, показали наличие среди них видов, которые могут быть использованы в современной биотехнологии фиторемедиации [11]. Дальнейшее исследование представителей этого семейства позволит пополнить список таких видов. Следует также отметить, что, несмотря на максимальное количество видов-гипераккумуляторов Zn в сем. *Brassicaceae*, сведения о влиянии его высоких концентраций на метаболизм растений этого семейства имеются лишь для ограниченного числа видов [12, 13].

Целью настоящего исследования являлось изучение аккумулирующих способностей и устойчивости по отношению к Zn вида флоры Северного Кавказа *Sisymbrium lipskyi* сем. *Brassicaceae* и оценка его фиторемедиационного потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объект исследования – гулявник Липского *Sisymbrium lipskyi* N. Busch – двулетнее травянистое растение высотой 30–50 см. Этот вид является субэндемиком Северного Кавказа и произрастает в горных районах с диапазоном высот от 1000 до 3000 м над уровнем моря в условиях умеренного континентального климата. Особенности вида является быстрый рост, хорошая приспособляемость к ксерофитным условиям местообитания, высокая продуктивность биомассы. *S. lipskyi* способен осваивать открытые местообитания, в том числе щебнистые горные склоны, где произрастает на хорошо дренированных примитивных горных почвах [14].

Сбор семян *S. lipskyi* проводили с растений, произрастающих на каменистых россыпях с разреженной травянистой растительностью в долине реки Малка в районе села Хабаз Кабардино-Балкарской Республики, 43°43'59" с. ш. 42°56'00" в. д., средняя высота 1300 м над уровнем моря. Следует отметить, что район сбора находится в пределах Малкинского ультрабазитового массива, сопряженного с рудопроявлениями тяжелых металлов: Fe, Ni и Zn [15].

Семена *S. lipskyi* (0.1 г) высевали в вегетационные сосуды с 1 кг песка, которые в опытных вариантах предварительно поливали раствором сульфата Zn в концентрациях 80, 160 и 320 мг/л в пересчете на металл. Затем песок поливали через сутки дистиллированной водой, а после прорастания семян – разбавленным в два раза питательным раствором Арнона до полной влагоемкости. Растения выращивали в течение двух месяцев в контролируемых условиях при температуре 23°C со световым периодом 14 ч и освещенностью 2730 лк на уровне розеток листьев. В каждом варианте опыта было использовано по шесть вегетационных сосудов. По окончании эксперимента растения разделяли на надземную часть и корни, которые выдерживали 30 мин в растворе хелатора двухвалентных катионов (15 мМ EGTA в буфере 2 мМ TRIS; 4 мМ MES, pH 6.0) для удаления поверхностно адсорбированных солей, затем промывали дистиллированной водой. Одновременно отбирали образцы листьев для анализа на содержание в них фотосинтетических пигментов. Сырую массу органов сеянцев определяли на аналитических весах с точностью до 0.1 мг, а затем фиксировали при 105°C и высушивали при 70°C до постоянного веса, после чего определяли сухую массу. Данные о различиях сырой и сухой массы использовали для расчета содержания воды в органах сеянцев.

Для определения влияния Zn на всхожесть предварительно обработанные 0.1% раствором KMnO₄ семена (по 100 штук) проращивали в

чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой (контроль) или раствором $ZnSO_4 \times 7H_2O$ в тех же концентрациях, которые использовали для выращивания опытных растений. Число проросших семян подсчитывали через 7 дней.

Определение содержания макро- и микроэлементов. Для измерения содержания макро- и микроэлементов измельченные сухие образцы растений (2 г) озоляли в муфельной печи при $450^\circ C$ в течение 12 ч. Зола растворяли в 6 мл смеси кислот: 1.5 М HCl и 3.71 М HNO_3 при нагревании, затем фильтровали и доводили объем до 25 мл бидистиллированной водой. Для извлечение подвижных форм Zn из образцов экспериментального песка навеску (3 г) заливали 30 мл 1 N ацетатно-аммонийного буфера с pH 4.8, встряхивали на ротаторе в течение 1 ч и фильтровали. Концентрации элементов в образцах растений и песке определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре фирмы «Кортек» (Россия). При анализе использовали государственные стандартные образцы: ГСО 8065-94, ГСО 7272-96 и ГСО 7325-96.

Определение содержания хлорофиллов и каротиноидов. Для определения содержания хлорофиллов и каротиноидов отдельно взвешивали третий полностью развитый лист из розетки листьев (0.1–0.15 г) и экстрагировали в 1.8 мл метанола в темноте при $+5^\circ C$ в течение суток, затем экстракт хранили при $-20^\circ C$ не более 5 сут до спектрофотометрирования. В двухлучевом сканирующем спектрофотометре УФ-6100 (Эковью, Россия), получив полный спектр поглощения экстракта в диапазоне 400–750 нм, определяли максимумы поглощения хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов, затем вычисляли содержание фотосинтетических пигментов по эмпирической формуле Lichtenthaler, Buschmann [16].

Статистическая обработка данных. Определения содержания макро- и микроэлементов, а также фотосинтетических пигментов в растениях проводилось в 6 биологических и 2 аналитических повторностях. На основании полученных данных был вычислен фактор транслокации – отношение содержания Zn в надземной части к его содержанию в корнях и коэффициент биологического накопления как отношение концентрации микроэлемента в надземной части к концентрации его подвижных форм в субстрате. Статистическую обработку материалов проводили в программе Statistica 12. Количественные данные представлены как средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность различий вариантов опыта по изученным параметрам оценивали по непараметрическому критерию Краскела-Уоллиса при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание Zn в среде выращивания

Средняя концентрация подвижных форм Zn, оставшихся в субстрате после внесения сульфата Zn, увеличивалась линейно во всем диапазоне изученных концентраций (рис. 1). Из образцов использованного в эксперименте песка 1 N ацетатно-аммонийным буфером было извлечено приблизительно 70–80% от внесенного Zn, что указывает на его высокую подвижность и доступность для растений. Данные об уровнях содержания Zn в субстрате были использованы для расчета величины коэффициента биологического накопления.

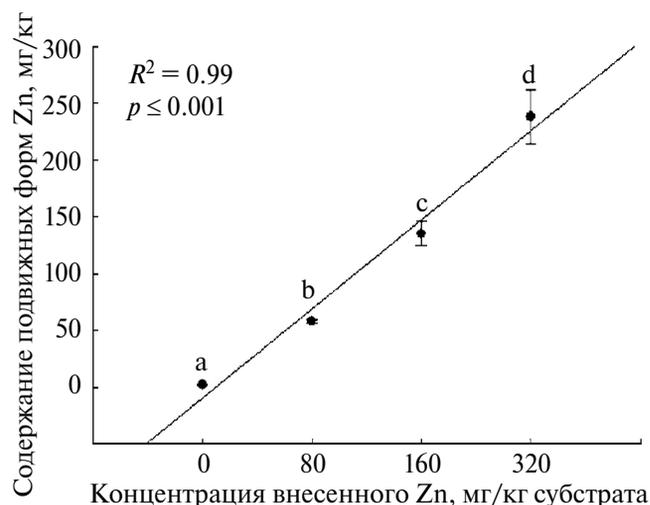


Рис. 1. Содержание подвижных форм Zn в субстрате после 2-месячного произрастания семян *Sisymbrium lypskyi*. Разными буквами обозначены значимые различия между вариантами опыта при $P < 0.05$.

Всхожесть и рост

Влияние избытка Zn на прорастание семян *S. lypskyi* проявилось в снижении их всхожести при концентрациях в субстрате 160 и 320 мг на 20 и 50% соответственно по сравнению с контрольными значениями (рис. 2). В этих вариантах отмечена также задержка появления всходов на 3–4 сут по сравнению с контрольным вариантом и вариантом с внесением 80 мг Zn, характеризующимися практически одинаковой всхожестью.

Дальнейшее развитие растений еще в большей степени, чем их всхожесть, зависело от концентрации Zn в субстрате. При минимальной из использованных концентраций Zn 80 мг рост и развитие растений практически не отличались от контрольного варианта. Напротив, в присутствии 160 мг Zn у 70% семян и особенно значительно, у более чем 90%

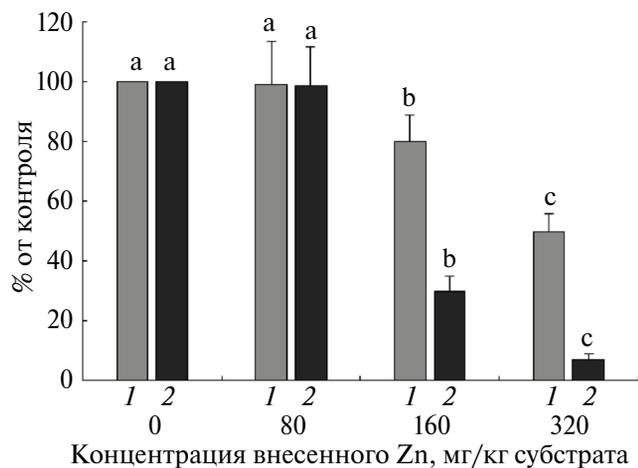


Рис. 2. Влияние Zn на всхожесть (1) и рост (2) семян *Sisymbrium lipskyi*. Обозначения статистической значимости различий приводятся отдельно для показателей всхожести и роста. Разными буквами обозначены значимые различия между вариантами опыта при $P < 0.05$.

сеянцев, при 320 мг Zn проявились симптомы его избытка, прежде всего, в визуальном наблюдении резком торможении роста и остановке развития растений в фазе семядольных листьев (рис. 2). У таких недоразвитых растений фиксировали утолщение и потемнение корешка, а также наличие хлорозов на семядольных листьях. Вместе с тем, нормально развитые растения имели в конце эксперимента розетку с 5–7 настоящими листьями без визуальных признаков хлороза.

На момент окончания эксперимента не было обнаружено статистически значимых различий в аккумуляции сухой биомассы одного растения между сеянцами вариантов 80 мг Zn и контрольного (рис. 2). В присутствии 160 мг Zn темпы ее

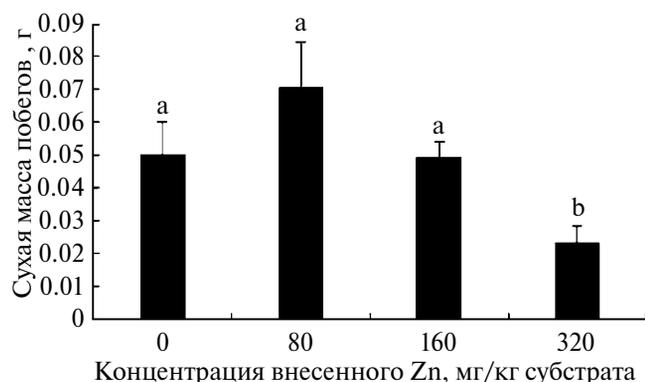


Рис. 3. Влияние 2-месячного воздействия Zn на накопление сухой биомассы надземных органов сеянцев *Sisymbrium lipskyi*. Приведены данные для нормально развитых растений. Разными буквами обозначены значимые различия между вариантами опыта при $P < 0.05$.

накопления у нормально развитых особей этого варианта также статистически значимо не отличались от контроля, угнетение аккумуляции биомассы у таких растений проявлялось лишь на фоне концентрации 320 мг.

Содержание Zn в органах

Данные о содержании Zn в корнях и листьях нормально развитых сеянцев представлены на рис. 3. Они показывают интенсивную аккумуляцию Zn в корнях и надземных органах сеянцев в условиях его избытка. В присутствии Zn в концентрации 80 мг его содержание в листьях сеянцев достигало 114 мг/кг, что превысило уровень элемента в контрольных растениях в 4 раза. При увеличении дозы Zn до 160 мг содержание его в надземных органах *S. lipskyi* продолжало увеличиваться, но в меньшей степени. В дальнейшем при нарастании избытка Zn до 320 мг его содержание в надземной части резко повышалось: в 22 раза по сравнению с контролем у нормально развитых сеянцев и в 57 раз в семядольных листьях недоразвитых сеянцев, в которых оно достигало 1700 мг/кг. Обнаружены различия в накоплении Zn в надземных и подземных органах. Содержание Zn в корнях в контрольном варианте было несколько выше, чем в листьях, однако различия между органами статистически не значимы. В то же время, в вариантах опыта с концентрацией Zn в субстрате 80 и 160 мг его содержание в корнях было статистически зна-

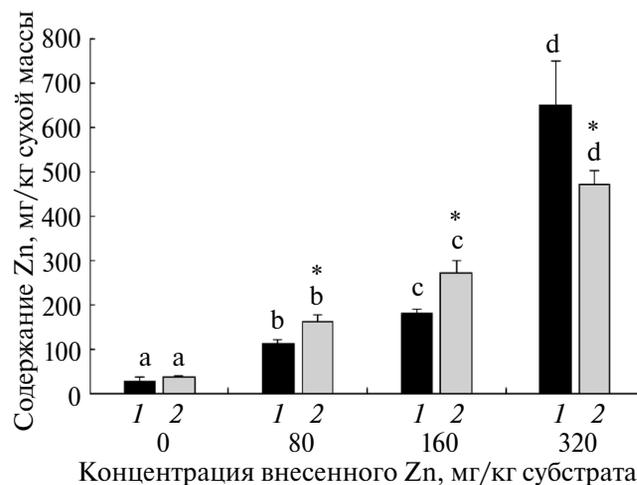


Рис. 4. Содержание Zn в корнях (1) и листьях (2) сеянцев *Sisymbrium lipskyi* после 2-месячного произрастания при разных уровнях Zn в субстрате. Обозначения статистической значимости различий приводятся отдельно для корней и листьев. Звездочкой обозначены статистически значимые различия между корнями и листьями для каждого из вариантов опыта. Приведены данные для нормально развитых растений. Разными буквами обозначены значимые различия между вариантами опыта при $P < 0.05$.

чимо выше, чем в листьях. Следует отметить, что в отличие от надземных органов, в корнях уровень Zn возрастал более равномерно по сравнению с надземными органами во всем диапазоне концентраций (рис. 3).

Накопление и распределение минеральных элементов

Результаты опыта показывали, что во всех вариантах содержание макроэлементов Ca и Mg в листьях было на порядок выше, чем в корнях (табл. 1). Разница в содержании K менее существенная: в 2–3 раза. В то же время в корнях *S. lipskyi* аккумулировалось в 2–6 раз больше Cu, чем в листьях. Но наибольшие различия по уровню содержания микроэлементов между корневой системой и надземной частью были обнаружены для Fe, уровень которого в корнях был в 3–13 раз выше, чем в надземной части. Следует отметить, что при выращивании в песчаной культуре растения *S. lipskyi* сохраняли присущий им в природных условиях ярко выраженный кальциотрофный тип минерального обмена, аккумулируя в листьях в 4–5 раз больше Ca, чем K.

В интервале концентраций Zn 0–160 мг не обнаружено значимых изменений в содержании K и Ca в корнях и надземной части нормально

развитых растений (табл. 1). Под действием дозы Zn 320 мг в корнях таких растений возрастало накопление Ca и значимо снижалось в их листьях. Наиболее существенно, в 2 раза по сравнению с соответствующими контрольными значениями, было снижено содержание Ca и K в семядольных листьях недоразвитых сеянцев. Следует отметить, что в листьях нормально развитых растений в этом варианте опыта содержание K, напротив, было выше контрольного значения. На фоне концентраций Zn 80 и 160 мг отмечено статистически значимое снижение уровня Mg в листьях сеянцев по сравнению с растениями в контрольном варианте.

В корнях растений, выращенных при дозе Zn 160 мг, наблюдали резкое увеличение накопления Fe, концентрация которого возросла в 4.4 раза по сравнению с контрольными растениями. При нарастании избытка Zn в субстрате до 320 мг содержание Fe в корнях продолжало расти, хотя и в меньшей степени. В то же время, в листьях сеянцев его накопление при этих дозах Zn было снижено по сравнению с контролем на 37 и 24% соответственно. Минимальное содержание Fe (падение на 43% от контроля) отмечалось в семядольных листьях недоразвитых особей. Под влиянием избытка Zn происходило изменение и в уровне накопления Mn и

Таблица 1. Содержание макро- и микроэлементов в органах сеянцев *Sisymbrium lipskyi*, произраставших в течение двух месяцев в песчаной культуре при разном уровне Zn в субстрате

Вариант опыта	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu
	%			мг/кг сухой массы		
Корни						
Контроль	1.14 ± 0.07 ^b	1.22 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.001 ^a	642 ± 8.95 ^a	8.85 ± 0.71 ^a	14.6 ± 0.67 ^a
Zn 80 мг/кг	1.27 ± 0.01 ^{ab}	1.21 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.001 ^a	626 ± 19.0 ^a	34.8 ± 2.79 ^{b*}	19.7 ± 0.83 ^b
Zn 160 мг/кг	1.33 ± 0.09 ^{ab}	2.01 ± 0.31 ^b	0.03 ± 0.004 ^b	1360 ± 12.2 ^b	31.1 ± 3.63 ^{b*}	17.2 ± 0.72 ^c
Zn 320 мг/кг	2.14 ± 0.01 ^c	1.60 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.002 ^a	1890 ± 58.1 ^c	121 ± 15.7 ^c	20.4 ± 0.15 ^b
Листья						
Контроль	3.03 ± 0.02 ^a	12.9 ± 0.14 ^a	0.61 ± 0.03 ^a	186 ± 20.4 ^a	41.1 ± 2.72 ^a	8.19 ± 0.09 ^a
Zn 80 мг/кг	3.02 ± 0.06 ^a	14.2 ± 0.31 ^b	0.48 ± 0.04 ^b	189 ± 11.9 ^a	25.8 ± 2.09 ^b	8.08 ± 0.25 ^a
Zn 160 мг/кг	3.42 ± 0.14 ^a	12.7 ± 0.24 ^a	0.47 ± 0.03 ^b	118 ± 22.8 ^b	26.6 ± 2.44 ^b	8.36 ± 0.26 ^a
Zn 320 мг/кг	<u>3.69 ± 0.27^b</u> 1.60 ± 0.34 ^c	<u>10.4 ± 0.53^c</u> 6.28 ± 0.27 ^d	<u>0.54 ± 0.04^{ab}</u> 0.51 ± 0.05 ^{ab}	<u>123 ± 14.2^b</u> 106 ± 17.5 ^c	<u>28.2 ± 4.55^b</u> 37.1 ± 9.33 ^b	<u>10.2 ± 0.21^b</u> 6.80 ± 2.17 ^c

Примечание: представлены среднеарифметические величины и стандартное отклонение, $n = 6$. Разными буквами обозначены значимые различия между вариантами опыта ($P < 0.05$). Звездочкой обозначены статистически незначимые различия между корнями и листьями для каждого из вариантов опыта. Для варианта Zn 320 мг/кг над чертой приведены данные для нормально развитых растений, под чертой – для недоразвитых растений.

Cu: содержание этих элементов в корнях также увеличивалось. Так, при воздействии 80 мг Zn содержание Mn в корнях возрастало в 4 раза, а 320 мг Zn – в 14 раз. В последнем варианте нельзя исключить, что увеличение содержания металла не явилось также следствием угнетения роста (эффект концентрирования). В отличие от корневой системы, рост содержания Zn в среде сопровождался падением уровня Mn в листьях сеянцев опытных вариантов на 30–40% по сравнению с его содержанием в контрольных растениях.

Содержание фотосинтетических пигментов

Количественная оценка фотосинтетических пигментов в листьях нормально развитых растений, выросших на среде с избытком Zn, выявила отсутствие значимых различий в содержании как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b* при концентрациях 80 и 160 мг Zn/кг субстрата по сравнению с соответствующими контрольными значениями (рис. 4). В то же время при дозе Zn 80 мг отмечено уменьшение уровня содержания каротиноидов на 30%. Максимальное негативное действие ZnSO₄ на содержание пигментов проявилось при дозе Zn 320 мг. Цинк в этой концентрации очень сильно – на 90% снижал содержание хлорофилла *b*, и существенно, на 64% – уровень каротиноидов (рис. 4).

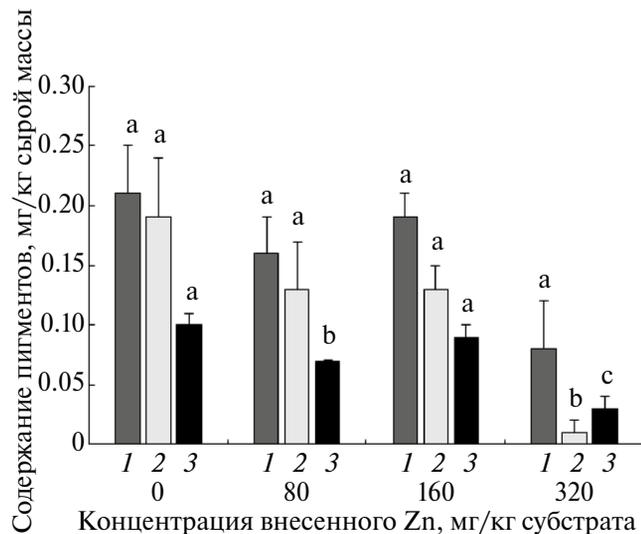


Рис. 5. Влияние 2-месячного воздействия Zn на содержание хлорофилла *a* (1), хлорофилла *b* (2) и каротиноидов (3) в листьях сеянцев *Sisymbrium lipskyi*. Обозначения статистической значимости различий приводятся отдельно для хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов. Приведены данные для нормально развитых растений. Разными буквами обозначены значимые различия между вариантами опыта при $P < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах с дикорастущими и культурными видами растений показано, что под влиянием избытка Zn в среде уменьшается всхожесть семян и энергия их прорастания [17]. С другой стороны, имеются данные о том, что прорастание семян устойчиво к воздействию его повышенных концентраций в субстрате [18]. Показано, что избыток Zn не препятствовал значительному прорастанию семян у *Coriandrum sativum* L. и *Medicago sativa* L., хотя и заметно подавлял рост корней проростков [19, 20]. Устойчивость начальных этапов прорастания семян к стрессу, вызванному влиянием высоких концентраций металлов, связана с низкой проницаемостью для них семенной кожуры большинства видов, вследствие чего период от начала набухания семени до ее прорыва кончиком корня наименее подвержен их токсическому действию. После образования первичного корня зародыш начинает получать питательные вещества из окружающей среды, что в условиях нашего эксперимента обусловило интенсивное поступление в растение Zn в повышенных концентрациях, повлекшее, в свою очередь, ингибирование роста части растений при его дозах 160 и 320 мг. Этот процесс может быть результатом как ингибирования митотической активности [17], так и нарушения растяжения клеток из-за снижения эластичности клеточных стенок или снижение их тургора [21].

Однако даже в варианте с максимальной концентрацией Zn 320 мг наряду с недоразвитыми особями имелись растения, которые переходили к следующей фазе онтогенетического цикла, хотя при этом и наблюдалось ингибирование накопления их биомассы (рис. 3). Столь существенные различия в росте и развитии растений, которые мы наблюдали в нашем эксперименте, свидетельствуют о внутривидовой дифференциации *S. lipskyi* по степени устойчивости к Zn, особенно ярко проявившейся при его максимальной концентрации. Ранее проведенные исследования устойчивости дикорастущих видов растений из районов обогащения почв Zn показали у ряда из них значительную внутривидовую неоднородность металлоустойчивости [22].

Известно, что уменьшение продуктивности является наиболее общей реакцией растений на воздействие избытка металлов в субстрате, поэтому накопление биомассы может выступать в качестве индикатора устойчивости к этому воздействию [3]. Растения *S. lipskyi* показали высокую устойчивость к Zn по этому показателю, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий в накоплении биомассы одного растения при дозе Zn 80 и 160 мг (рис. 2). Избыток Zn в субстрате не вызывал также сни-

жения оводненности листьев *S. lipskyi*. Причем этот показатель не отличался от контрольного даже у семядольных листьев недоразвитых растений и для всех вариантов опыта был достаточно высоким 89–91%. Предположительно, *S. lipskyi* как растение, приспособленное к ксерофитным условиям обитания, может быть адаптировано к факторам, влияющим на водный режим. Известно также, что в присутствии повышенных концентраций металлов оводненность клеток и тканей уменьшается в гораздо меньшей степени, чем остальные показатели водного режима растений, что связано главным образом с увеличением устьичного сопротивления и/или снижением транспирации [23].

Установлено, что при оптимальных содержаниях Zn в среде чаще наблюдается акропетальный характер его распределения, но при избыточных концентрациях – базипетальный [1]. Это соответствует результатам нашего исследования, согласно которым на фоне повышенных содержаний Zn (80 и 160 мг) уровень его аккумуляции в корнях возрастал в большей степени, чем в листьях. Вместе с тем увеличение содержания Zn в субстрате приводило не только к усилению его поступления в корневую систему, но и увеличению накопления Zn в надземных органах сеянцев (рис. 3). При этом степень изменений в содержании элемента в надземной части при разном интервале концентраций неодинакова. Так, если в интервале 80–160 мг Zn его содержание в листьях увеличивается в 1.6 раза, то при переходе от 160 к 320 мг – в 3.6 раза. Подобное явление наблюдалось у другого вида сем. *Brassicaceae* *Lepidium ruderale*, в побегах которого накопление Zn практически не менялось в интервале концентраций 20–40 мМ, в то время как при 40–80 мМ оно возрастало почти в 2 раза [12]. По нашим данным, при градиенте концентраций 0–160 мг Zn в среде у *S. lipskyi* возрастает значение корней как органов, выполняющих барьерную функцию при передвижении Zn в надземные органы, что обеспечивает повышенную толерантность растений к избытку металла [1]. Однако при дозе Zn 320 мг характер его распределения в органах сеянцев изменился, и доля Zn, поступившего в надземную часть, относительно его содержания в целом растении повысилась с 40 до 60%. По-видимому, доза Zn 320 мг оказалась токсичной для *S. lipskyi*, что проявилось в нарушении физиологических механизмов контроля передвижения Zn в растении. Полученные нами данные подтвердили также вывод, сделанный при изучении действия металла на 14-дневные сеянцы ячменя, о возрастании скорости поглощения Zn в условиях, когда общее его содержание в почве превышает некоторую пороговую величину в области 200–300 мг/кг [24]. Следует отметить, что в этом же интервале содержаний в

нашем эксперименте начинают проявляться негативные биологические эффекты токсического действия избытка Zn, регистрируемые по изменению показателей накопления сухой биомассы (рис. 2).

Избыток Zn в среде оказал влияние и на накопление физиологически необходимых макро- и микроэлементов в органах сеянцев. Наиболее выраженный ингибирующий эффект на фоне повышенных доз Zn обнаружен в отношении накопления Mg в листьях сеянцев, аккумуляция которого в них значимо снижалась в интервале концентраций 0–160 мг Zn/кг субстрата (табл. 1). Известно, что благодаря сходному ионному радиусу Zn может заменить Mg, ингибируя тем самым накопление хлорофилла [25]. Меньшее влияние оказал избыток Zn на содержание Ca и K в листьях. Причем реакция была разнонаправленной: концентрация Ca при дозе Zn 320 мг уменьшалась, а содержание K увеличивалось. Возрастание уровня этого макроэлемента при действии избытка Zn наблюдали в мезофилле листа, а также ксилеме и флоэме у *Zygophyllum fabago* [26]. При этом было высказано предположение, что транспорт K к надземным органам у растений, испытывающих стресс от избытка Zn, может способствовать улучшению фотосинтеза и установлению трансмембранного градиента pH, необходимого для синтеза АТФ.

При повышенных дозах Zn одновременно происходило увеличение накопления Fe в корнях и снижение его концентрации в надземной части по сравнению с контролем (табл. 1). Это, по-видимому, явилось следствием нарушения передвижения металла из корневой системы в надземные органы. Антагонистические взаимоотношения между Fe и Zn, усиливающиеся при повышенных концентрациях последнего в среде, подтверждаются результатами многих исследований [1]. В частности, избыток Zn задерживал передвижение Fe в надземную часть, не снижая его поглощения, у *Phlomis tuberosa* [27]. Увеличение концентрации Fe в корнях и торможение его транспорта под влиянием токсических доз Zn показано также в опытах с водной культурой *Pinus sylvestris* [28]. Согласно литературным данным, вызванное избытком Zn снижение концентрации Fe в побегах обусловлено конкуренцией в процессах хелатирования, обеспечивающих транслокацию обоих элементов из корней в надземные органы [29]. Так, оба металла как в ксилеме, так и во флоэме хелатируются одними и теми же хелаторами – никотианамином и цитратом. Следовательно, конкуренция между Zn и Fe за хелатирование может привести к Zn-индуцированному снижению содержания Fe в побегах, что было показано, например, для *Arabidopsis halleri* и *Glycine max* [30, 31].

По-видимому, дефицит Fe явился одной из причин развития визуально наблюдаемых симптомов хлороза семядольных листьев недоразвитых особей *S. lipskyi*, в которых был отмечен наиболее низкий уровень элемента (табл. 1). Следует отметить, что на фоне избыточного поступления Zn аккумуляция его больших количеств в надземных органах нарушала нормальное соотношение Zn с другими металлами, свойственное *S. lipskyi*. Резко упало, например, отношение Fe к Zn. Так, при исследованных концентрациях Zn в среде оно уменьшилось в 4–29 раз. Это может вызвать расстройство и дезорганизацию различных физиологических функций. Таким образом, можно предположить, что при избытке Zn в среде изменение элементного состава растений обусловлено не только его конкурентным влиянием на поглощение других металлов, что было описано ранее [1], но и изменением течения метаболических реакций в растении в результате накопления Zn в токсических концентрациях.

Обращает на себя внимание тот факт, что в контрольном варианте концентрация Mn в листьях была выше, чем в корнях в 4.6 раза. При выращивании растений на субстратах, содержащих повышенные дозы Zn, концентрация Mn в корнях резко увеличивалась, что сопровождалось статистически значимым падением уровня этого элемента в надземной части *S. lipskyi* (табл. 1). Аналогичные закономерности взаимодействия этих элементов были показаны и для других видов растений [32]. В то же время обнаружено, что у некоторых видов, например *Saccharum* spp., усиление аккумуляции Mn в корнях в условиях избытка Zn в среде не сопровождалось ингибированием его накопления в надземной части [33]. По нашим данным, испытанные концентрации Zn вызывали также увеличение уровня Cu в корнях сеянцев, способствуя ее поглощению (табл. 1). Подобное явление наблюдали в опытах с растениями *Phlomis tuberosa*, экспонировавшимися на растворах с повышенным содержанием Zn [27]. Значительное синергетическое действие Zn в условиях его избытка на поглощение Cu было установлено также для корневой системы *Triticum aestivum* [34].

Нарушение минерального питания и, прежде всего, поступления и распределения Fe, Mn и Mg, является, по-видимому, основной причиной токсического влияния избытка Zn на процесс фотосинтеза [32]. Так, у многолетнего злака *Polypogon monspeliensis* было описано влияние Zn на процесс фотоокисления воды из-за замены марганца в Mn-содержащем комплексе ФС II, что препятствовало переносу электронов наряду с выделением O₂ [35]. Цинк, замещая Mg²⁺ в Рубиско, снижал ассимиляцию CO₂ у кустарника *Limoniastrum monopetalum* и тем самым вызывал снижение интенсивности фотосинтеза [36].

Обусловленное избытком Zn ингибирование фотосинтетического аппарата, может быть непосредственно связано и с изменениями в содержании пигментов. По литературным данным, в листьях *Sinapis alba* под влиянием Zn в дозе 100 мг/кг субстрата концентрация хлорофилла *a* и каротиноидов снижалась на 30%, а хлорофилла *b* на 50% по сравнению с контрольными значениями [13]. Как показали результаты нашего исследования, в интервале концентраций Zn 0–160 мг не наблюдалось статистически значимых изменений в содержании хлорофиллов в листьях *S. lipskiy* (рис. 4). В этих пределах незначительно изменялось и соотношение хлорофиллов *a/b* (1.43–1.67), а также отношение суммы хлорофиллов к каротиноидам (3.73–3.96). Отсутствие значимых количественных изменений в содержании хлорофиллов при концентрациях Zn в субстрате 80 и 160 мг указывает на устойчивость к ним фотосинтетического аппарата *S. lipskiy*. Негативное влияние на него проявилось только при наивысшей из использованных концентраций 320 мг (рис. 4). При этом наиболее значительно (в 6.5 раз) снижалось среднее содержание хлорофилла *b*, а соотношение *a/b* возрастало в 3.5 раза по сравнению с контролем. Увеличение концентрации Zn в корнеобитаемой среде приводило к снижению содержания хлорофиллов и каротиноидов у целого ряда растений. Например, на фоне высокой концентрации Zn отмечено уменьшение содержания хлорофилла *b* и последующее увеличение отношения хлорофиллов *a/b* в листьях *Miscanthus × giganteus*, что указывает на более высокую чувствительность хлорофилла *b* к стрессу, вызванному избытком Zn, по сравнению с хлорофиллом *a* и каротиноидами [37]. Вместе с тем более устойчивые к Zn виды, например *Sinapis alba*, отличались отсутствием каких-либо значимых изменений в концентрации пигментов, что обеспечивало успешную работу фотосинтетического аппарата растений в условиях их выращивания в песчаной культуре при концентрациях Zn от 1 до 5 мМ [38].

В оценке фиторемедиационного потенциала вида ключевая роль принадлежит таким показателям как фактор транслокации и коэффициент биологического накопления. По величине первого оценивается эффективность транспорта элементов из подземных органов в надземные. Второй характеризует поглотительную способность растений. Эти показатели зависят от ряда причин, в том числе от природы элемента, видовой стратегии растения по отношению к данному элементу, концентрации его в питательной среде. Растения, характеризующиеся величинами коэффициента биологического накопления и фактора транслокации выше 1, могут быть использованы в целях фитоэкстракции металлов из загрязненных почв, а имеющие коэф-

коэффициент биологического накопления выше 1 наряду с показателем фактора транслокации ниже 1 — пригодны для фитостабилизации почв, загрязненных металлами [6]. По нашим данным коэффициент биологического накопления Zn в растениях *S. lipskyi* во всех вариантах опыта превышал 1 (рис. 6). При этом его значение снижалось от 12.3 (контроль) до 1.34 (160 мг Zn) и увеличивалось в 2 раза при дозе 320 мг. В диапазоне концентраций Zn 0–160 мг величина фактора транслокации была ниже 1 (рис. 6). Она уменьшалась от 0.78 до 0.67 с ростом дозы Zn в среде и лишь на фоне 320 мг Zn возрастала до 1.38. Достаточно низкие значения фактора транслокации свидетельствуют об ограниченном перемещении Zn из корней в листья сеянцев. На этом основании можно утверждать, что *S. lipskyi* представляет собой вид растений исключателей, у которых металлы накапливаются, в большей степени, в корнях. Такие растения можно рассматривать как перспективные для целей фитостабилизации почв, загрязненных потенциально токсичными элементами.

Таким образом, в настоящей работе выявлены особенности аккумуляции Zn и его влияния

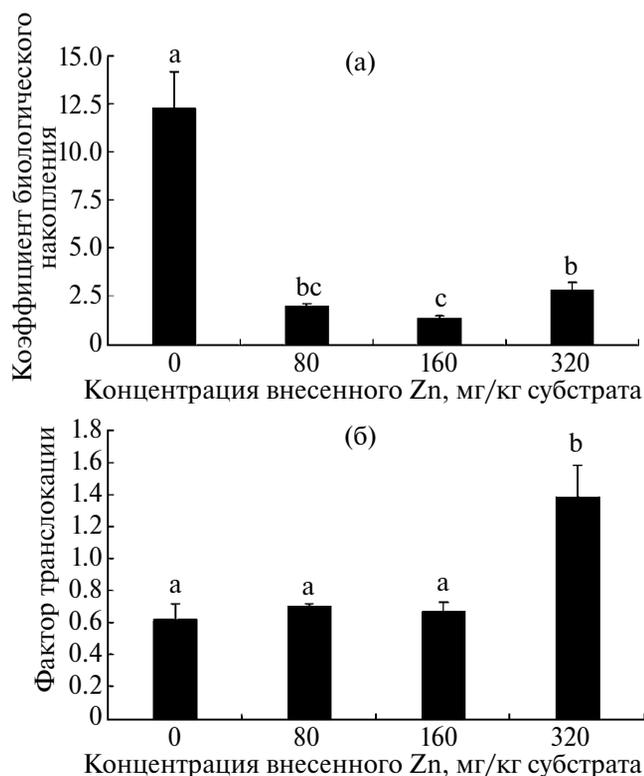


Рис. 6. Отношение содержания Zn в листьях сеянцев *Sisymbrium lipskyi* к его содержанию в субстрате (коэффициент биологического накопления) (а) и отношение содержания Zn в листьях к его содержанию в корнях (фактор транслокации) (б) после 2-месячного произрастания при разных уровнях Zn в субстрате. Разными буквами обозначены значимые различия между вариантами опыта при $P < 0.05$.

на накопление биомассы, содержание хлорофиллов, каротиноидов и минеральный состав северокавказского вида гулявника Липского *S. lipskyi*. В целом, полученные данные позволяют сделать вывод об относительно высокой устойчивости данного вида к повышенным концентрациям Zn. В интервале концентраций от 0 до 160 мг Zn/кг субстрата не было отмечено статистически значимого снижения аккумуляции сухой биомассы и содержания хлорофиллов в листьях нормально развитых сеянцев *S. lipskyi*. Во всем диапазоне изученных концентраций Zn не обнаружено нарушение водного статуса надземных органов сеянцев. Следует отметить, что концентрация 160 мг Zn/кг характеризует средний уровень загрязнения, в 7 раз превышающий показатель предельно допустимой концентрации подвижных форм Zn в почве [39].

Однако доза 320 мг Zn оказалась токсичной для *S. lipskyi*. В присутствии элемента в этой концентрации было обнаружено прекращение ростовых процессов у более чем 90% сеянцев, ингибировалось накопление биомассы и содержания хлорофилла *b*, а также каротиноидов в ассимилирующих органах, происходило нарушение физиологических механизмов контроля поступления Zn в растение.

Изучение минерального состава *S. lipskyi* в условиях высоких концентраций Zn выявило однонаправленность изменений в содержании Fe и Mn: избыток Zn способствовал аккумуляции этих элементов в корнях и тормозил их поступление в надземные органы. На фоне повышенных концентраций Zn в среде уменьшалось содержание Mg в листьях сеянцев. Снижение накопления Mg, Fe и Mn в надземных органах сеянцев, подвергшихся стрессу из-за избытка Zn в субстрате, было следствием ингибирования механизмов активного транспорта данных элементов. Вместе с тем, нарушение минерального питания при концентрациях Zn 80 и 160 мг в субстрате не вызвало значимых количественных изменений в содержании пигментов, что указывает на устойчивость к ним фотосинтетического аппарата *S. lipskyi* и подтверждается отсутствием визуальных проявлений хлороза на листьях нормально развитых сеянцев. Значения фактора транслокации Zn во всех вариантах опыта, за исключением варианта 320 мг Zn/кг субстрата, были меньше 1. В соответствии с относительно низкими значениями этого показателя можно утверждать, что *S. lipskyi* представляет собой вид растений, способных ограничивать поступление потенциально токсичных элементов в надземные органы и аккумулировать более высокое их количество в корнях. Эта особенность минерального обмена, наряду с относительно высокой устойчивостью к Zn, позволяет рассматривать *S. lipskyi*

как перспективный вид для фитостабилизации почв при средних уровнях загрязнения. Принимая во внимание тот факт, что *S. lipskyi* хорошо адаптирован к ксерофитным условиям местообитания, его способность произрастать с большим обилием на горных примитивных почвах, данный вид можно рекомендовать для рекультивации отвалов горнодобывающей промышленности, восстановления растительности в районах геологоразведки и т. п.

Авторы выражают искреннюю благодарность д.б.н. В.И. Дорофееву за консультации по вопросам флористики и помощь в сборе материала для исследования.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (плановые темы № 121032500047-1 и № 1021071912881-5-1.6.11).

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. Kabata-Pendias A., Pendias H. Trace elements in soils and plants. Boca Raton: CRC Press LLC, 2001. 432 p.
2. Плеханова И.О., Бамбушева В.А. Экстракционные методы изучения состояния тяжелых металлов в почвах и их сравнительная оценка // Почвоведение. 2010. Т. 9. С. 1081.
3. Marschner H. Marschner's Mineral nutrition of higher plants. London: Elsevier Ltd., 2012. 651 p.
4. Bonnet M., Camares O., Veisseire P. Effect of Zinc and influence of *Acremonium lolli* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activity of ryegrass // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 945. <http://doi.org/10.1093/jxb/51.346.945>
5. Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A. Zinc in plants // New Phytol. 2007. V. 173. P. 677. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>
6. Reeves R.D., Baker A.J.M., Jaffré T., Erskine P.D., Echevarria G., Van Der Ent A. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements // New Phytol. 2017. V. 218. P. 407. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.14907>
7. McIntyre T. PhytoRem: A Global CD-ROM database of aquatic and terrestrial plants that sequester, accumulate, or hyperaccumulate heavy metals. Hull, Quebec: Environment Canada, 2001.
8. Azizi M., Faz A., Zornoza R., Martinez-Martinez S., Acosta J.A. Phytoremediation potential of native plant species in mine soils polluted by metal(loid)s and rare earth elements // Plants. 2023. V. 12. P. 1219. <http://doi.org/10.3390/plants12061219>
9. Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaisse F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginocchio R., Jaffré T., Johns R., McIntyre T., Purvis O. et al. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation // Restor. Ecol. 2004. V. 12. P. 106. <https://doi.org/10.1111/j.1061-2971.2004.00367.x>
10. Pollard A.J., Powell K.D., Harper F.A., Smith J.A.C. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants // Crit. Rev. Plant Sci. 2002. V. 21. P. 539. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044359>
11. Drozdova I., Alekseeva-Popova N., Kalimova I., Bech J., Roca N. Research of reclamation of polluted mine soils by native metallophytes: some cases // Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis. 2019. V. 19. P. 164. <https://doi.org/10.1144/geochem2018-037>
12. Kozhevnikova A.D., Erlikh N.T., Zhukovskaya N.V., Obroucheva N.V., Ivanov V.B., Belinskaya A.A., Khutoryanskaya M.Y., Seregin I.V. Nickel and zinc effects, accumulation and distribution in ruderal plants *Lepidium ruderales* and *Capsella bursa-pastoris* // Acta Physiol. Plant. 2014. V. 36. P. 3291. <http://doi.org/10.1007/s11738-014-1697-3>
13. Repkina N., Nilova I., Kaznina N. Effect of zinc excess in substrate on physiological responses of *Sinapis alba* L. // Plants. 2023. V. 12. P. 211. <https://doi.org/10.3390/plants12010211>
14. Дорофеев В.И. Brassicaceae Burnett, nom. cons., nom. alt. (Cruciferae Juss., nom. cons.). Конспект флоры Кавказа / Под ред. А.Л. Тахтаджяна. СПб.-М.: Товарищество научных изданий КМК. 2012. С. 371.
15. Потаненко Ю.Я. Геология Карачаево-Черкесии. Карачаевск: Карачаево-Черкесский государственный университет. 2004. 154 с.
16. Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy // Current protocols in food analytical chemistry. 2001. P. F4.2. <http://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
17. Mahmoudi H., Salah I.B., Zaouali W., Zorrig W., Smaoui A., Ali T., Gruber M., Ouerghi Z., Hosni K. Impact of zinc excess on germination, growth parameters and oxidative stress of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2021. V. 106. P. 899. <http://doi.org/10.1007/s00128-021-03188-6>
18. Kholodova V.P., Volkov K.S., Kuznetsov V.I. Adaptation of the common ice plant to high copper and zinc concentrations and their potential using for phytoremediation // Russ. J. Plant Physiol. 2005. V. 52. P. 748. <http://doi.org/10.1007/s11183-005-0111-9>
19. Marichali A., Dallali S., Ouerghemmi S., Sebeia H., Hosni K. Germination, morpho-physiological and biochemical responses of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to zinc excess // Ind. Crops Prod. 2014. V. 55. P. 248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.033>

20. *Yahaghi Z., Shirvani M., Nourbakhsh F., Pueyo J.J.* Uptake and effects of lead and zinc on alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth: Role of plant growth promoting bacteria // *South African Journal of Botany*. 2019. V. 124. P. 573. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.006>
21. *Liščáková P., Namaz A., Molnárová M.* Reciprocal effects of copper and zinc in plants // *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2022. V. 19. P. 9297. <http://doi.org/10.1007/s13762-021-03854-6>
22. *Алексеева-Попова Н.В., Моченят К.И.* Внутрипопуляционные различия реакции *Salvia stepposa* на избыток цинка в среде // Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов / Под ред. Н.В. Алексеевой-Поповой. Ленинград: Лениздат, 1991. С. 47.
23. *Тумов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В.* Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2014. 194 с.
24. *Лаврентьева Г.В.* Поведение тяжелых металлов Co, Cu, Zn, Cd и радионуклидов ⁶⁰Co, ⁶⁵Zn в системе твердая фаза почв – почвенный раствор – растение. Дис. ... канд. биол. наук. Обнинск. 2008. 148 с.
25. *Tripathy B.C., Pattanayak G.* Chlorophyll biosynthesis in higher plants // *Photosynthesis* / Eds. J.J. Eaton-Rye et al. Springer. 2012. P. 63. http://doi.org/10.1007/978-94-007-1579-0_3
26. *Lefèvre I., Vogel-Mikuš K., Jeromel L., Vavpetič P., Planchon S., Arčon I., T. Van Elteren J., Lepoint G., Gobert S., Renaut J., Pelicon P., Lutts S.* Differential cadmium and zinc distribution in relation to their physiological impact in the leaves of the accumulating *Zygophyllum fabago* L. // *Plant, Cell Environ.* 2014. V. 37. P. 1299. <http://doi.org/10.1111/pce.12234>
27. *Давыдова В.Н., Моченят К.И.* Накопление и распределение металлов у *Phlomis tuberosa* при избытке цинка в среде // Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов / Под ред. Н.В. Алексеевой-Поповой. Ленинград: Лениздат. 1991. С. 80.
28. *Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Марченко С.И., Иванов В.П.* Анализ ростовых процессов *Pinus sylvestris* L. на ранних стадиях онтогенеза в условиях хронического действия цинка // *Лесной журнал*. 2011. Т. 2. С. 12.
29. *Glińska S., Gapińska M., Michlewska S., Skiba E., Kubicki J.* Analysis of *Triticum aestivum* seedling response to the excess of zinc // *Protoplasma*. 2016. V. 253. P. 367. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0816-3>
30. *Cornu J.-Y., Deinlein U., Horeth S., Braun M., Schmidt H., Weber M., Persson D.P., Husted S., Schjoerring J.K., Clemens S.* Contrasting effects of nicotianamine synthase knockdown on zinc and nickel tolerance and accumulation in the zinc/cadmium hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // *New Phytol.* 2015. V. 206. P. 738. <https://doi.org/10.1111/nph.13237>
31. *Ibiang Y.B., Mitsumoto H., Kazunori S.* Bradyrhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi modulate manganese, iron, phosphorus, and polyphenols in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under excess zinc // *Environ. Exp. Bot.* 2017. V. 137. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.011>
32. *Kaur H., Garg N.* Zinc toxicity in plants: a review // *Planta*. 2021. V. 253. P. 129. <http://doi.org/10.1007/s00425-021-03642-z>
33. *Jain A., Srivastava S., Solomon S., Shrivastava A.K.* Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.) // *Acta Physiol. Plant.* 2010. V. 32. P. 979. <http://doi.org/10.1007/s11738-010-0487-9>
34. *Tani F.H., Barrington S.* Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part II. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) // *Environmental Pollution*. 2005. V. 138. P. 548. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.004>
35. *Ouni Y., Mateos-Naranjo E., Abdelly C., Lakhdar R.* Interactive effect of salinity and zinc stress on growth and photosynthetic responses of the perennial grass, *Polypogon monspeliensis* // *Ecological Engineering*. 2016. V. 95. P. 171. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.067>
36. *Cambrollé J., Mancilla-Leytón J.M., Muñoz-Vallés S., Luque T., Figueroa M.E.* Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides* // *Chemosphere*. 2012. V. 86. P. 867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.039>
37. *Andrejić G., Gajić G., Prica M., Dželetović Ž, Rakić T.* Zinc accumulation, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll a fluorescence in Zn-stressed *Miscanthus × giganteus* plants // *Photosynthetica*. 2018. V. 56. P. 1249. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0827-3>
38. *Задворная А.К., Казнина Н.М., Холопцева Е.С.* Влияние повышенных концентраций цинка в субстрате на рост и фотосинтетический аппарат горчицы белой // *Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология № 3* / Под ред. В.А. Илюха. Петрозаводск: Институт биологии КарНЦ РАН, 2021. С. 68. <http://doi.org/10.17076/eb1392>
39. СанПин 4266-87. Методические указания по оценке степени опасности загрязнения почвы химическими веществами. Москва: Министерство здравоохранения СССР, 1987. 25 с.

УДК 581.198

КАТИОННАЯ ПЕРОКСИДАЗА СОРГО И ЕЕ УЧАСТИЕ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

© 2024 г. Е. В. Щербакова^{a, b, *}, Е. В. Дубровская^b, Н. Н. Позднякова^b,
А. А. Галицкая^{a, b}, О. В. Турковская^b

^aСаратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

^bИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр
“Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, Россия

*e-mail: elizaveta-sch@mail.ru

Поступила в редакцию 01.11.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принята к публикации 08.11.2023 г.

Из проростков сорго веничного (*Sorghum bicolor* L. Moench) впервые выделили минорную катионную пероксидазу (МКП) с относительной электрофоретической подвижностью в ПААГ (Rf) равной 0.03. Ее молекулярная масса, определенная методом гель-фильтрации, была равна 155 кДа. В структуре фермента выявили три субъединицы с молекулярной массой в 35, 25 и 16 кДа. Пероксидазную и оксидазную активность МКП в диапазоне рН от 2.6 до 7.0 анализировали с использованием 2,6-диметоксифенола (ДМФ), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) аммония (АБТС) и аскорбиновой кислоты (АСК). Максимальные показатели пероксидазной и оксидазной активности получили по отношению к АСК при рН 7.0 и 4.0 соответственно. При этом удельная активность пероксидазной реакции превышала таковую для оксидазной реакции в 68 раз. Значения K_m для АБТС составили 0.23 и 0.32 мкмоль при пероксидазном и оксидазном окислении соответственно. Исследовали влияние некоторых металлов и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) на активность МКП. В присутствии натрия ее активность увеличивалась примерно в 2.5 раза, а в присутствии антрацена – в 8 раз. Фермент эффективно окислял нативные ПАУ с АБТС в качестве медиатора: 90% антрацена, 80% фенантрена, 20% флуорантена и 15% пирена. Установлено, что наиболее активно трансформации подвергались трехкольцевые ПАУ, убыль которых была в 5 раз больше, чем убыль ПАУ с четырьмя кольцами. Таким образом, обнаруженная стимуляция активности МКП в присутствии загрязнителей неорганической и органической природы и способность окислять ряд нативных ПАУ могут свидетельствовать об ее активном участии в защите растения в условиях загрязнения.

Ключевые слова: *Sorghum bicolor* L. Moench, минорная катионная пероксидаза, неорганические и органические загрязнители

DOI: 10.31857/S0015330324010145, EDN: NVGIDC

ВВЕДЕНИЕ

Сорго веничное (*Sorghum bicolor* L. Moench) является одной из пяти наиболее значимых сельскохозяйственных культур, возделываемых по всему миру [1]. Этот злак обладает высоким биоремедиационным потенциалом и в условиях лабораторного эксперимента он снижает концентрацию полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) на 21–98% [2]. Также он

устойчив к ряду тяжелых металлов и способен к их аккумуляции [3]. Устойчивость сорго во многом зависит от работы ферментов антиоксидантных систем организма. К основным системам относят: супероксиддисмутазную (СОДС), пероксидазную, аскорбатпероксидазную и каталазную системы. Не умаляя вклад в жизнедеятельность растений каждой из них, отдельно следует сказать о пероксидазной системе. Пероксидазы, помимо участия в нормальном функционировании организма, куда стоит включить метаболизм ауксинов [4], прорастание семян, рост и созревание плодов [5], дыхание [6] и сигналинг [7], задействованы также в предотвращении развития патологий, а именно в заживлении ран [8], пассивной и активной защите от пато-

Сокращения: АФА – активные формы азота; МКП – минорная катионная пероксидаза; *o*-ДАЗ – *o*-дианизидин; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; СОДС – супероксиддисмутазная система; АБТС – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония; АСК – аскорбиновая кислота; ДМФ – 2,6-диметоксифенол; Rf – относительная подвижность белка.

генов [9], лигнификации и суберизации [10] и, что особенно важно, в метаболизме АФК и активных форм азота (АФА) [7]. Несмотря на то, что первой линией ферментативной защиты растения от окислительного стресса является СОДС, пероксидазы протопласта и клеточной стенки восстанавливают связанные с мембраной перекисные липиды, поддерживают окислительно-восстановительный гомеостаз клетки, участвуют в процессинге белка, регулируют нормальное функционирование эпигенетических процессов, а также катализируют преобразование перекиси водорода в менее реакционно активные кислород и воду [7, 11].

Перекись водорода – не единственный субстрат растительных пероксидаз. В силу своей специфичности они способны окислять широкий спектр соединений неорганической и органической природы [11], однако сведений об их участии в трансформации различного рода загрязнителей недостаточно [12]. Детоксикационная функция растительных пероксидаз изучена в меньшей мере, а имеющиеся в настоящее время данные о пероксидазах сорго в большинстве случаев затрагивают влияние различных стрессоров на работу антиоксидантной системы в целом [13]. Так, X. Gou с соавт. [11] провели оценку смягчающего действия азотных и фосфорных удобрений на рост и устойчивость сорго, выращенного в условиях высокого содержания солей в почве. Повышение активности ферментов антиоксидантной системы, в том числе пероксидаз, стало доказательством благоприятного воздействия азота и фосфора на морфологические и биохимические показатели сорго, выращенного на засоленных почвах. Примером также может послужить исследование S.M. El-Ganainy с соавт. [14], в котором оценивали эффективность использования покрытых гуминовой кислотой железосодержащих наночастиц в борьбе с вызванным *Acremonium strictum* увяданием и в увеличении роста и урожайности сорго. В качестве показателя эффективности авторы выбрали активность пероксидаз и каталаз, которая значительно повышалась при определенных концентрациях наночастиц.

Недостаток данных об участии пероксидаз в системе защиты растения от различного рода загрязнений и о конкретных пероксидазах такого перспективного ремедианта как сорго указывает на актуальность нашего исследования. Проекционным направлением исследования пероксидаз сорго является их участие в ремедиации [13]. Из-за распространенности ПАУ в почве они могут быть одним из доступных субстратов растительных пероксидаз, что делает возможным применение растений в ремедиации почв и водоемов, пострадавших от действия токсических загрязнений [15]. Предметом представленного

исследования является характеристика ранее не описанной минорной катионной пероксидазы (МКП) сорго и выявление ее протективного потенциала в условиях загрязнения. Была выдвинута рабочая гипотеза, согласно которой МКП в условиях поллютантного стресса не только сохраняет свою активность, но и непосредственно участвует в детоксикации загрязнителей. Для подтверждения или опровержения рабочей гипотезы сформулированы следующие задачи: определение молекулярной массы МКП, характеристика каталитической активности, способности к окислению спектра субстратов при различных показателях рН и в присутствии в среде металлов и ПАУ. При этом особый интерес представляет оценка эффективности трансформации этим ферментом нативных ПАУ, как одних из наиболее устойчивых поллютантов окружающей среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование растений

В качестве объекта исследования использовали 5-суточные проростки сорго веничного (*Sorghum bicolor* L. Moench) сорта Капитал, семена которого были предоставлены Федеральным государственным бюджетным научным учреждением “Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы” (г. Саратов, Россия). Откалиброванные семена промывали водопроводной водой, а затем стерилизовали раствором гипохлорита натрия на протяжении 30 мин [17]. Далее семена промывали кипяченой водой и культивировали в чашках Петри на смоченных ею же фильтрах в течение пяти суток при постоянной температуре в 28°C в темноте.

Получение ферментных экстрактов растений и очистка пероксидаз

Этиолированные проростки гомогенизировали в охлажденной ступке с речным песком и 0.05 М фосфатным буфером с рН 6.0. Для удаления дебриса грубый ферментный препарат внутриклеточных пероксидаз центрифугировали 15 мин при 4°C и 2604 g. Белки осаждали на ледяной бане сульфатом аммония и оставляли на холоде в течение 12 ч [16–18]. В результате дробного высаливания было обнаружено, что около 65% белков с наибольшей пероксидазной активностью выпадало в осадок при 60% насыщении сульфатом аммония. Однако осаждение части белка с пероксидазной активностью проходило вплоть до 80%. В последующем эти белки отделяли от надосадочной жидкости центрифугированием на протяжении 15 мин при 4°C и 10414 g и диализировали в течение 12 ч против фосфатного буфера с рН 6.0 [1]. Полученный фермент-

ный препарат концентрировали в 3–4 раза методом ультрафильтрации на ячейке Amicon PM-10 концентратора Stirred Ultrafiltration Cell (“Merck KGaA”, Германия). Пробы объемом менее 10 мл концентрировали с использованием мини концентратора Vivaspin 2 (“Sartorius AG”, Германия). Сконцентрированный образец наносили на колонку для гель-фильтрации Sephacryl S-200 HR (“Pharmacia”, Швеция), предварительно уравновешенную 0.05 М фосфатным буфером, содержащим 0.15 М хлорида натрия. Объем колонки составлял 120 мл, объем фракций – 2 мл, скорость потока – 1 мл/мин. [16]. Изоферментный состав определяли методом Орнштейна-Дэвиса [19] в неденатурирующих условиях на аппарате для вертикального гель-электрофореза Helikon Pouch Pack Basic (“Helicon”, Россия) с последующим окрашиванием *o*-дианизидином (*o*-ДАЗ) в присутствии перекиси водорода [16]. Активные фракции объединяли и использовали для характеристики МКП.

Определение молекулярной массы МКП

Молекулярную массу электрофоретически гомогенной МКП находили методом гель-фильтрации. В качестве маркерных белков использовали алкогольдегидрогеназу, кональбумин и пероксидазу хрена, молекулярная масса которых равна 150, 75 и 44 кДа соответственно. Субъединичный состав этого фермента определяли гель-электрофорезом в ПААГ по методу Laemmly [20] в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием с использованием набора Pierce™ Color Silver (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Определение активности МКП

Пероксидазную и оксидазную активность МКП характеризовали с использованием 2,6-диметоксифенола (ДМФ) [21], 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) аммония (АБТС) [22] и аскорбиновой кислоты (АСК), конечная концентрация которых составляла 0.5×10^{-2} , 0.1×10^{-2} и 1.7×10^{-2} М соответственно. Для указанных субстратов использовали следующие буферы: для ДМФ – 0.05 М фосфатный буфер с pH 6.0, АБТС – 0.05 М тартратный буфер с pH 3.6, АСК – 0.05 М фосфатный буфер с pH 7.0. Активность МКП определяли на спектрофотометре Evolution 60 (“Thermo Fisher Scientific”, США) при длине оптического пути в 1 см [16]. Длина волны составляла 468 нм для ДМФ, 436 нм для АБТС и 290 нм для АСК. Влияние pH на скорость реакций анализировали с использованием буферных растворов по Макилвейну в диапазоне pH от 2.6 до 7.0. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль про-

дукта в течение 1 мин при комнатной температуре [23]. Удельную активность МКП выражали в мкмоль/мин/мг белка. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда, в реакционную смесь объемом 1 мл вносили 0.95 мл реактива Бредфорда и 0.05 мл ферментного экстракта. Время протекания реакции составляло 30 мин, оптическую плотность измеряли при 595 нм [24]. Измерения проводили минимум в трех аналитических повторностях.

Характеристика каталитических свойств МКП

Для определения величин K_M для пероксидазной и оксидазной реакций МКП использовали АБТС [25]. В реакциях по пероксидазному пути его концентрация составляла $0.1–0.5 \times 10^{-6}$ М, а в реакциях по оксидазному пути – $0.15–1.15 \times 10^{-6}$ М. Оптическую плотность фиксировали при 436 нм. В качестве контроля использовали тартратный буфер с pH 3.6. Измерения проводили минимум в трех аналитических повторностях.

Определение влияния загрязнителей на активность МКП

Зависимость активности МКП от присутствия загрязнителей находили путем добавления в среду к прорастающим семенам хлоридов металлов и ПАУ. Использовали хлориды следующих металлов: натрия (2000 мг/л) [26], магния (500 мг/л), меди (10 мг/л), цинка (10 мг/л), железа (3 мг/л) [27] и марганца (1 мг/л). Для определения действия ПАУ на очищенный фермент выбрали антрацен и фенантрен, конечная концентрация которых составляла 0.2×10^{-3} М. Об окисляющей способности МКП судили спектрофотометрически по убыли АСК или образованию окрашенного продукта окисления ДМФ или АБТС. Измерения проводили минимум в трех аналитических повторностях, а статистическую обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Excel, где средние значения и доверительные интервалы вычисляли при $P \leq 0.05$.

Соокисление МКП нативных ПАУ

Способность МКП к соокислению нативных ПАУ анализировали по отношению к трех- (антрацен и фенантрен) и четырехкольцевым (флуорантен и пирен) представителям. Для ферментативного окисления антрацен, фенантрен [28], флуорантен [29] и пирен [30] предварительно растворяли в ацетонитриле до конечной концентрации 2.2×10^{-3} и 2.0×10^{-3} М соответственно для трех- и четырехкольцевых ПАУ. Реакцию окисления останавливали добавлением 2 мл хлороформа, в нем же трижды экстрагировали производные окисленных ПАУ в течение 5 мин.

Экстракт выпаривали досуха, а сухой остаток перерастворяли в 0.5 мл ацетонитрила. Убыль ПАУ анализировали методом ВЭЖХ на колонке Zorbax Eclipse PАН Analytical (4.6 м × 250 мм × 5 мкм) ("Agilent", США). Помимо смеси нативных ПАУ в реакционную смесь добавляли АБТС, который выступал в роли медиатора и способствовал более эффективному разложению субстратов [22]. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Excel, где средние значения и доверительные интервалы вычисляли при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изоформный состав пероксидаз сорго и влияние на него загрязнителей

По окрашенному продукту окисления *o*-ДАЗ обнаружили изоформный состав пероксидаз в неочищенном ферментном препарате. Он был представлен девятью формами с относительной электрофоретической подвижностью в ПААГ (Rf) 0.03, 0.09, 0.16, 0.25, 0.56, 0.59, 0.62, 0.72 и 0.78 (рис. 1а). Доминировали пероксидазы со значениями Rf 0.09 и 0.16. Добавление в среду культивирования проростков хлоридов металлов приводило к увеличению интенсивности полосы с Rf 0.62 (рис. 1б). ПАУ оказывали схожий эффект: доминировали четыре изоформы пероксидаз с Rf 0.56, 0.59, 0.72 и 0.78 (рис. 1в).

Rf, молекулярная масса и субъединичный состав МКП

В результате ряда этапов очистки, включающей фракционирование сульфатом аммония, диализ и гель-фильтрацию (рис. 2а, б), в электрофоретически гомогенном виде была получена МКП, Rf которой составляла 0.03 (рис. 2в). Полоса активности этой пероксидазы присутствовала во всех образцах, и положение ее оставалось неизменным. Молекулярная масса МКП по данным гель-фильтрации составляла 155 кДа. На субъединичную структуру этой пероксидазы указывали данные денатурирующего гель-электрофореза с ДДС. Минимум три субъединицы входили в состав МКП, их молекулярная масса составляла 35, 25 и 16 кДа (рис. 3а, б).

Каталитическая характеристика МКП

МКП проверяли на способность окислять ряд субстратов как в присутствии перекиси водорода, так и без нее в диапазоне pH от 2.6 до 7.0. Максимальные показатели пероксидазной активности получили при следующих значениях pH: для ДМФ – 4.6, АБТС – 2.6, АСК – 7.0 (рис. 4а, б), а оксидазной активности – при pH: для ДМФ – 7.0, АБТС – 5.6, АСК – 4.0 (рис. 4в, г). Максимальная удельная пероксидазная активность наблюдалась по отношению к АСК – 6.5×10^{-7} моль/мин/мг белка. Для ДМФ и АБТС показатели близ-

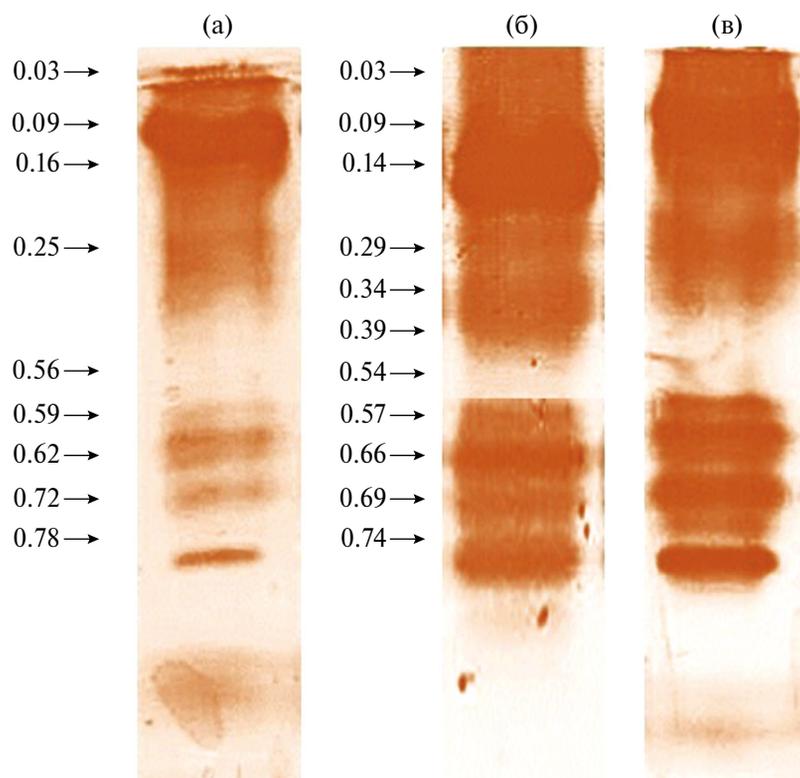


Рис. 1. Изоферментный состав пероксидаз в грубом ферментном препарате проростков сорго веничного (*Sorghum bicolor*) (а) и в нем же при наличии в среде культивирования марганца (б) и фенантрена (в).

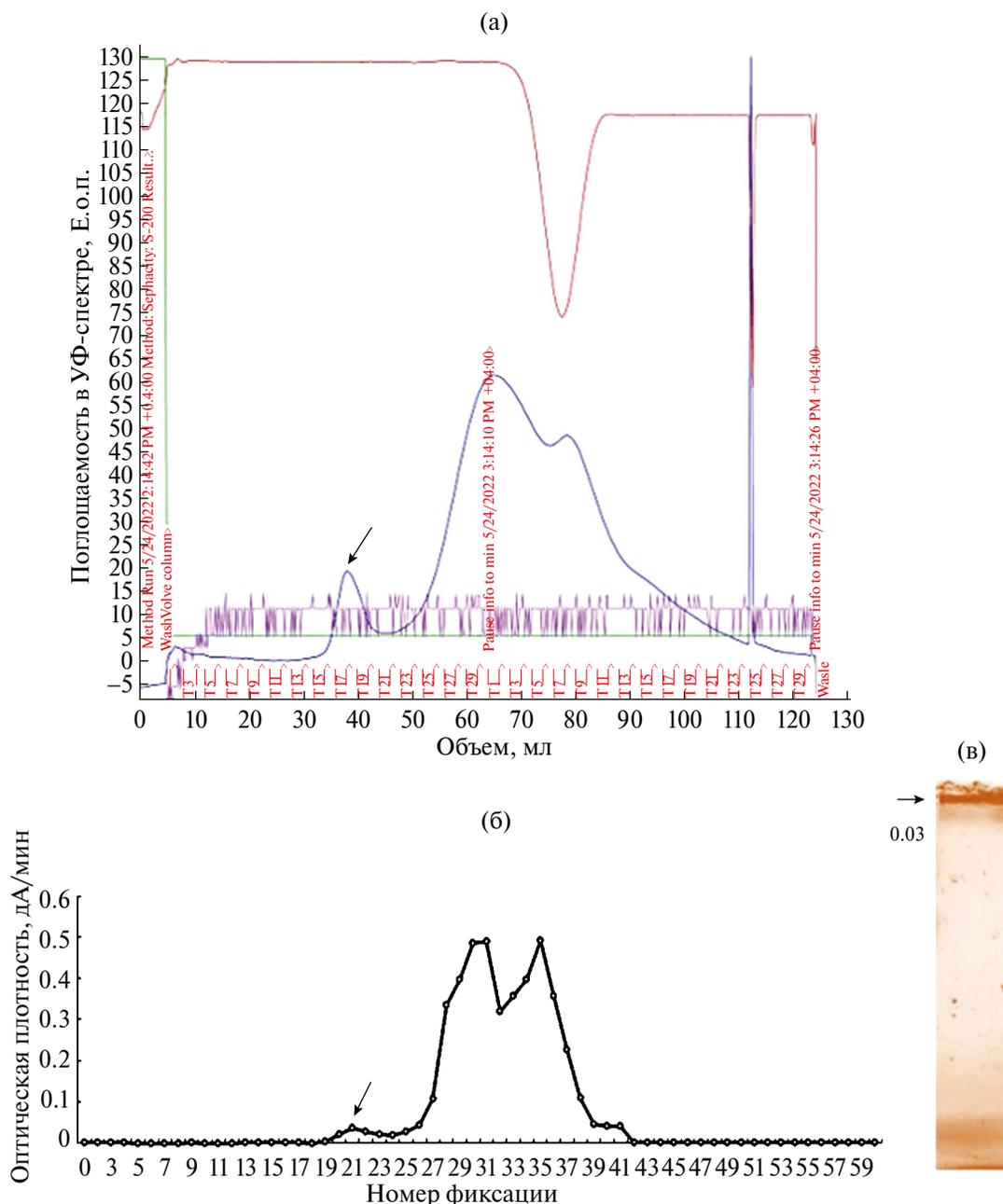


Рис. 2. Минорная катионная пероксидаза (МКП) проростков сорго веничного (*Sorghum bicolor*) на хроматограмме в УФ-спектре (а), графике распределения пероксидазной активности по профилю хроматограммы (б) и зимограмме после гель-фильтрации (в). Е.о.п. — единицы оптической плотности.

ки — 4.2×10^{-8} и 5.0×10^{-8} моль/мин/мг белка. Удельная оксидазная активность увеличивалась в ряду АБТС, ДМФ и АСК, достигая при этом 2.8×10^{-11} , 4.1×10^{-11} и 9.6×10^{-9} моль/мин/мг белка соответственно. Стоит отметить, что удельная оксидазная активность МКП к ДМФ превышала таковую для АБТС в 1.5 раза.

Скорость пероксидазной реакции выходила на плато при концентрации АБТС 0.4×10^{-6} М, что позволило определить максимальную скорость реакции (V_{\max}) и K_M [25]. Установлено, что V_{\max} реакции по пероксидазному пути составляла 4.1×10^{-8} моль/мин/мг белка, а K_M —

0.23×10^{-6} М. Скорость оксидазной реакции МКП выходила на плато при концентрации субстрата 0.65×10^{-6} М, что позволило определить значения V_{\max} и K_M : 1.4×10^{-10} моль/мин/мг белка и 0.32×10^{-6} М соответственно.

Характеристика устойчивости пероксидазной системы к действию загрязнителей

Влияние неорганических загрязнителей на активность пероксидазной системы сорго определяли путем добавления в среду культивирования проростков хлоридов различных металлов. В общем пуле пероксидаз было выявлено как положительное, так и отрицательное влияние хло-

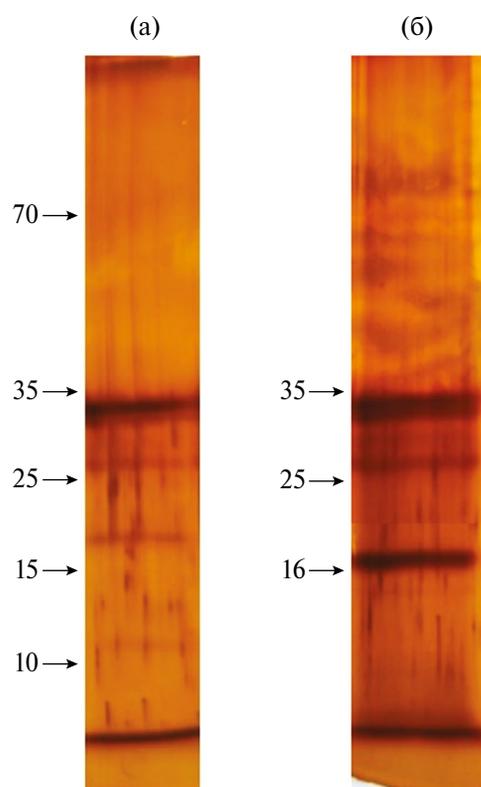


Рис. 3. Расположение маркерных белков (а) и субъединиц МКП (б) при ДДС-электрофорезе.

ридов металлов на их активность. В сравнении с контролем пероксидазная активность увеличивалась по отношению к ДМФ и АБТС. Для ДМФ ее прирост составил: 10, 25, 30, 50, 145 и 160% в присутствии Fe, Zn, Cu, Mg, Na и Mn соответственно (рис. 5). В случае АБТС рост активности составил от 120 до 295%, она увеличивалась в ряду – Zn, Cu, Mn, Na, Fe и Mg. Спад активности относительно контроля по отношению к АСК составлял от 5 до 95%, она уменьшалась в ряду – Na, Mg, Mn, Cu, Fe и Zn. Стоит отметить, что активность общего пула пероксидаз в присутствии хлорида натрия в среде культивирования значительно повышалась по отношению к ДМФ и АБТС и незначительно понижалась по отношению к АСК. В частности, было установлено, что активность очищенной МКП из проростков, выращенных в среде с добавлением хлорида натрия, по отношению к АБТС более чем в 7 раз превышала контрольные значения.

Влияние органических загрязнителей на активность пероксидазной системы сорго определяли путем добавления в среду трехкольцевых ПАУ. На наличие количественных изменений указывали показатели удельной пероксидазной активности ферментных препаратов. В частности, было установлено, что активность очищенной МКП из проростков, выращенных в среде с добавлением фенантрена и антрацена, по отношению к АБТС превышала контрольные значения в 3 (рис. 6б) и 8 раз (рис. 6в) соответственно.

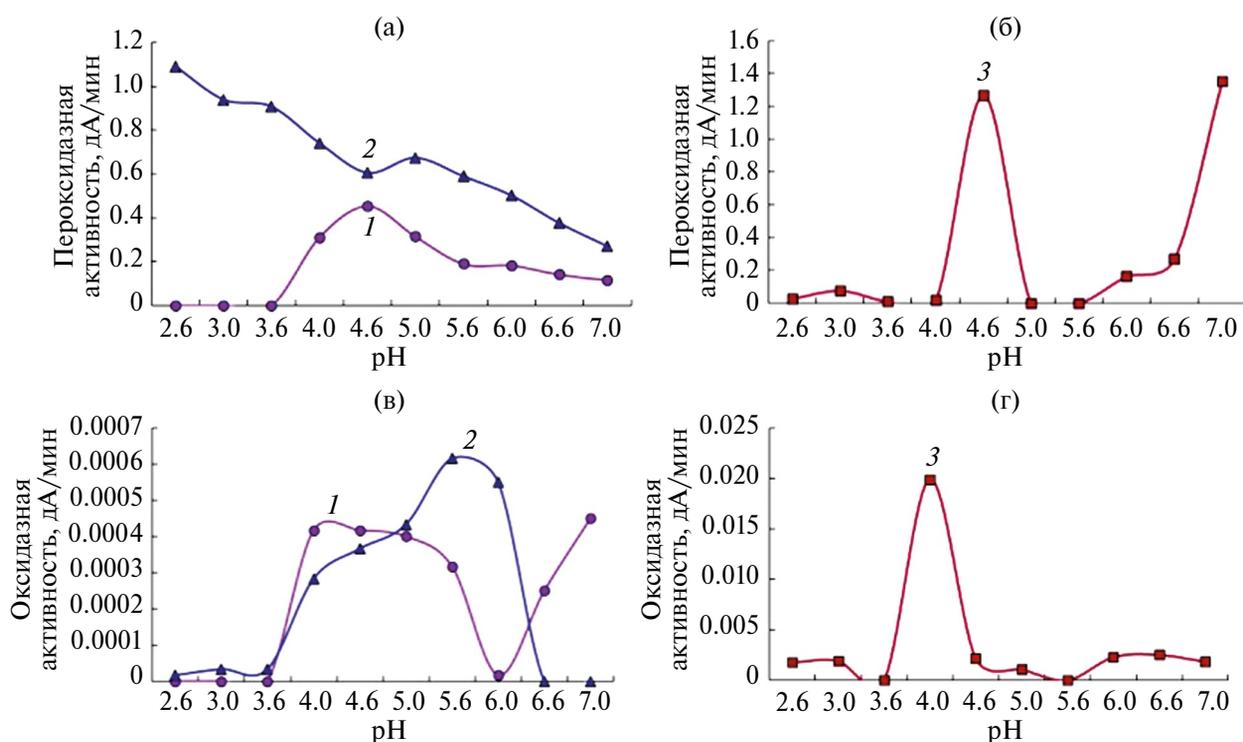


Рис. 4. Оптимумы pH для пероксидазной (а, б) и оксидазной (в, г) реакций МКП из проростков сорго веничного (*Sorghum bicolor*): 1 – 2,6-диметоксифенол (ДМФ), 2 – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)аммония (АБТС), 3 – аскорбиновая кислота (АСК).

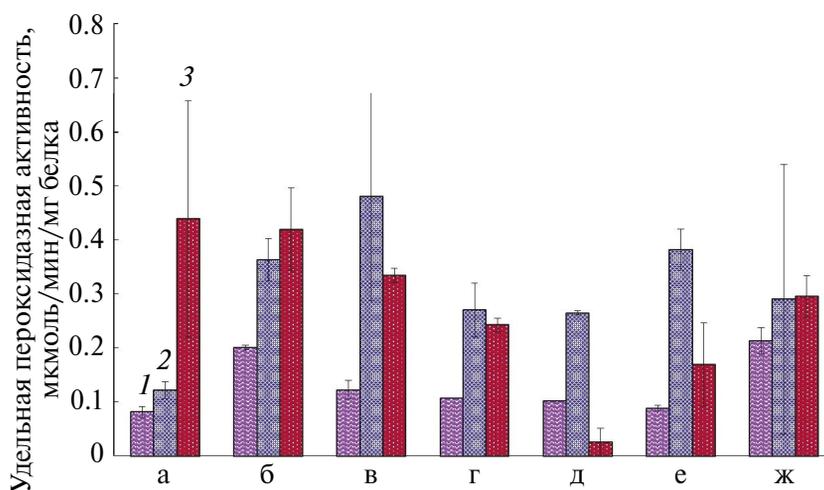


Рис. 5. Окисление пероксидазной системой проростков сорго веничного (*Sorghum bicolor*) субстратов в отсутствие (а) и в присутствии солей металлов: натрий (б), магний (в), медь (г), цинк (д), железо (е), марганец (ж): 1 – ДМФ, 2 – АБТС, 3 – АСК.

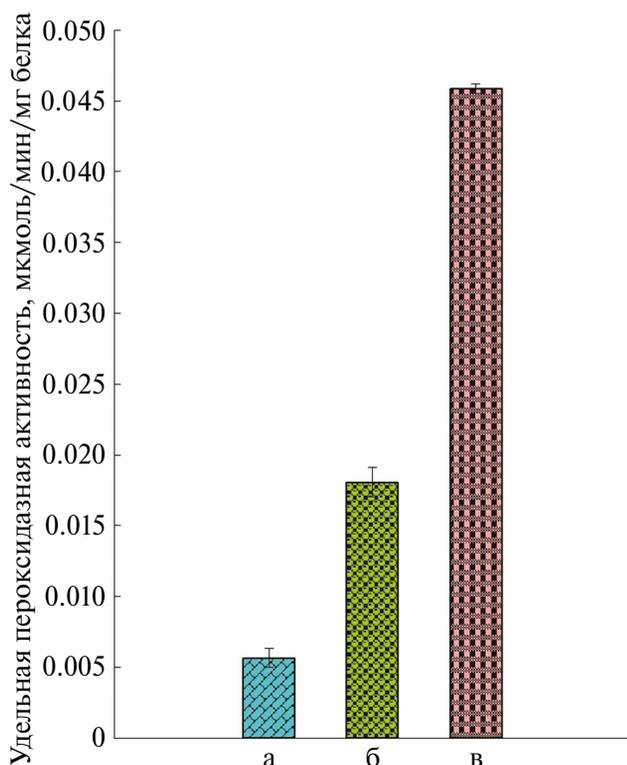


Рис. 6. Окисление АБТС МКП проростков сорго веничного (*Sorghum bicolor*) в отсутствие (а) и в присутствии ПАУ: фенантрен (б), антрацен (в).

Окислительная способность МКП по отношению к нативным ПАУ

Под влиянием очищенной МКП происходила убыль всех выбранных ПАУ, она составляла: 90, 80, 20, 15% соответственно для антрацена, фенантрена, флуорантена и пирена. Важно отметить, что наиболее активно трансформации

подвергались трехкольцевые ПАУ, убыль которых была в 5 раз больше, что особенно значимо, учитывая их более легкое поступление внутрь растения с водой.

ОБСУЖДЕНИЕ

Растительные пероксидазы являются одними из самых распространенных ферментов, обеспечивающих нормальное функционирование клеток на всех этапах развития растения [12]. При изменении условий окружающей среды меняется и пероксидазный состав, что связано с активацией или ингибированием отдельных его изоформ. Подтверждением лабильности пероксидазной системы является изменение пероксидазного профиля проростков сорго под влиянием неорганических и органических эффекторов, затрагивающих состав доминирующих форм. При этом во всех вариантах присутствовала МКП, которая может играть важную роль в защите растения от действия различного рода загрязнителей. Ранее нами были изучены доминирующие формы катионной и анионной пероксидазы сорго [17, 31], обладающие способностью к детоксификации ряда ароматических поллютантов. Присутствие в среде культивирования хлоридов металлов или ПАУ повышало активность МКП. Фермент способен эффективно окислять трехкольцевые ПАУ, что свидетельствует о его участии в реализации ремедиационного потенциала сорго. Характеристика выделенной нами пероксидазы расширяет знания о функционировании пероксидазной системы сорго в условиях загрязнения.

Молекулярная масса растительных пероксидаз широко варьирует и составляет от 17 до

240 кДа [15]. Описанные ранее пероксидазы сорго имели молекулярную массу от 35 [1, 32] до 50 кДа [1, 16, 33]. Молекулярная масса выделенной нами МКП (155 кДа) оказалась значительно выше, причиной чего может быть как выявленная мультидоменная структура, так и степень гликозилирования растительных пероксидаз, которая зависит от множества факторов, в том числе от условий и стадии роста растения [34]. Установление структуры МКП представляет несомненный интерес и является предметом дальнейших исследований.

Пероксидазы способны к пероксидазному и оксидазному окислению субстратов, что обеспечивает активное участие этих ферментов в контроле АФК, образующихся из-за действия на растение различных факторов окружающей среды [35]. В зависимости от характера фактора в ответ может активироваться та или иная функция фермента. В ходе исследования нами была обнаружена способность МКП окислять АБТС и АСК как в пероксидазной, так и в оксидазной реакциях. Эта способность особенно интересна для характеристики сорго как ремедианта, поскольку продукты оксидазного окисления этих соединений могут выступать в роли медиаторов и активировать реакции по пероксидазному пути более устойчивых соединений [22]. Для описанной нами ранее доминирующей катионной пероксидазы из корней сорго [16] оксидазная активность не установлена.

Металлы необходимы для существования всех живых организмов, небольшие их концентрации, называемые физиологическими, не опасны для организма и принимают участие в жизненно необходимых процессах. При превышении физиологических концентраций металлы представляют угрозу для организма [36]. В таком случае их воздействие вызывает окислительный стресс, в ответ на который активируются антиоксидантные ферменты, в том числе и пероксидазы [37]. Для выявления реакции пероксидазной системы сорго на присутствие в среде металлов мы использовали их в концентрациях, превышающих ПДК в 10 раз [32], что оказывало заметный эффект на их физиологическое состояние. P. Soudek с соавт. [3] отметили снижение пероксидазной и глутатионтрансферазной активности в корнях сорго в присутствии кадмия и цинка. В то же время из исследований Y. Lyubin с соавт. [31] известно, что окислительный потенциал пероксидаз сорго при развитии стрессовой реакции взрослого растения активировал кадмий. По нашим данным, пероксидазная активность в проростках значительно увеличивалась в присутствии натрия и марганца – в среднем в 2.5 раза. В частности, установлено, что окисление АБТС при нали-

чии в среде натрия более чем в 7 раз превышало контрольные значения.

Энзиматическая трансформация, производимая растениями, зависит от характеристик загрязнителя [38]. В соответствии с количеством бензольных колец выделяют легкие и тяжелые ПАУ. Легкими называют ПАУ, содержащие до четырех бензольных колец, а тяжелыми – ПАУ более чем с четырьмя бензольными кольцами. Количество колец напрямую связано с липофильностью этих загрязнителей, которая способствует их сохранению в окружающей среде в течение длительного времени [39]. Ранее мы не обнаружили влияния фенантрена на окисляющую способность пероксидаз взрослых растений сорго [16]. Однако в случае проростков присутствие в среде трехкольцевых ПАУ стимулировало работу антиоксидантной системы организма, в разы увеличивая активность пероксидаз. Это можно объяснить тем, что ответная реакция растения на загрязнители зависит от множества различных факторов окружающей среды, начиная температурой и рН почвы и заканчивая типом и концентрацией загрязнителя, а также от физиологического или генетического статуса растения [40].

Поскольку АБТС является одним из возможных органических медиаторов окисления ПАУ, активность МКП анализировали по реакциям с этим субстратом. В присутствии АБТС МКП была способна к окислению ряда нативных ПАУ, при этом наиболее активно трансформация проходила у трехкольцевых представителей, убыль которых была примерно в 5 раз выше. Это связано, вероятно, с более низким потенциалом ионизации этих соединений. Подобная зависимость наблюдалась и при окислении ПАУ пероксидазой хрена [22].

Таким образом, из проростков сорго впервые выделена и охарактеризована МКП, которая наряду с пероксидазной обладает также и оксидазной активностью, что делает возможным инициацию пероксидазного цикла реакций продуктами оксидазного окисления. Обнаруженная стимуляция активности МКП в присутствии неорганических и органических загрязнителей и способность окислять ряд ПАУ свидетельствуют об ее активном участии в защите растения в условиях загрязнения.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр РАН”, тема № 1022040700974-4.

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

В исследованиях использовалось оборудование Центра коллективного пользования (ЦКП) “Симбиоз” ИБФРМ РАН.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nnamchi C.I., Parkin G., Efimov I., Basran J., Kwon H., Svistunenko D.A., Agirre J., Okolo B.N., Moneke A., Nwanguma B.C., Moody P.C.E., Raven E.L. Structural and spectroscopic characterisation of a heme peroxidase from sorghum // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2016. V. 21. P. 63. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1313-z>
2. Турковская О.В., Муратова А.Ю., Дубровская Е.В., Бондаренкова А.Д., Любунь Е.В. Фиторемедиационный потенциал сорго веничного для очистки земель от углеводородов нефти и тяжелых металлов // *Аграрный научный журнал.* 2020. С. 50. <https://doi.org/10.28983/asj.y2020i12pp50-54>
3. Soudek P., Petrova S., Vankova R., Song J., Vanek T. Accumulation of heavy metals using *Sorghum* sp. // *Chemosphere.* 2014. V. 104. P. 15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.079>
4. Estrada B., Bernal M.A., Díaz J., Pomar F., Merino F. Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. P. 6234. <https://doi.org/10.1021/jf000190x>
5. Khan A.A., Robinson D.S. Purification of anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa) // *Food Chemistry.* 1993. V. 46. P. 61.
6. Kay E., Shannon L., Lew J.Y. Peroxidase isozymes from horseradish root. II. Catalytic properties // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 2470.
7. Bela K., Riyazuddin R., Csiszar J. Plant glutathione peroxidases: Non-heme peroxidases with large functional flexibility as a Core Component of ROS-processing mechanisms and signalling // *Antioxidants.* 2022. V. 11. P. 1624. <https://doi.org/10.3390/antiox11081624>
8. Allison S.D., Schultz J. Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.) // *Chem. Ecol.* 2004. V. 30. P. 1363. <https://doi.org/10.1023/b:joec.0000037745.66972.3e>
9. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1367. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1367>
10. Barcelo A.R., Pomer F. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls // *Phytochem.* 2001. V. 57. P. 1105. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00050-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00050-4)
11. Guo X., Wu Q., Zhang Z., Zhu G., Zhou G. Nitrogen and phosphorus counteracted the adverse effects of salt on *Sorghum* by Improving ROS scavenging and osmotic regulation // *Agronomy.* 2023. V. 13. P. 1020. <https://doi.org/10.3390/agronomy13041020>
12. Газарян И.Г., Хушпультян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // *Успехи биол. химии.* 2006. Т. 46. С. 303.
13. Kumari N., Sharma I., Alam A., Sharma V. Oxidative stress and role of antioxidant machinery in two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) to combat the damage induced by *Macrophomina phaseolina* // *Eur. J. Biotechnol. Biosci.* 2015. V. 3. P. 5. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1450491>
14. El-Ganainy S.M., El-Bakery A.M., Hafez H.M., Ismail A.M., El-Abdeen A.Z., Elgalel Ata A.A., Abd Elraheem O.A.Y., El Kady Y.M.Y., Hamouda A.F., El-Beltagi H.S., Shehata W.F., Shalaby T.A., Abbas A.O., Almaghsa M.I., Sattar M.N. et al. Humic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles confer resistance to *Acremonium* wilt disease and improve physiological and morphological attributes of grain *Sorghum* // *Polymers.* 2022. V. 14. P. 3099. <https://doi.org/10.3390/polym14153099>
15. Pandey V.P., Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N. A Comprehensive review on function and application of plant peroxidases // *Anal. Biochem.* 2017. V. 6. P. 1. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
16. Dubrovskaya E.V., Pozdnyakova N.N., Grinev V.S., Muratova A.Yu., Golubev S.N., Bondarenkova A.D., Turkovskaya O.V. Dominant form of cationic peroxidase from sorghum roots // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 338. <https://doi.org/10.1134/S1021443716030055>
17. Nnamchi C.I., Okolo B.N., Moneke A.N., Nwanguma B.C., Amadi O.C., Efimov I. Spectroscopic and kinetic properties of purified peroxidase from germinated *Sorghum* grains // *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2022. V. 80. P. 316. <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1939639>
18. Pandey V.P., Singh S., Singh R., Dwivedi U.N. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 167. P. 367. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9672-1>
19. Лебедев Л.П., Чепрасова М.Ю., Волкова Н.В. Методы разделения и очистки биополимеров (учебное пособие). Барнаул: Типография Алтайского государственного университета, 2019. 51 с.
20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
21. Thongkred P., Lotrakul P., Prasongsuk S., Imai T., Punnapayak P. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a tropical isolate of *Pycnoporus coccineus* and its laccase // *Sci. Asia.* 2011. V. 37. P. 225. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2011.37.225>
22. Chen Z., Li H., Peng A., Gao Y. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase

- in water containing an organic cosolvent // Environ. Sci. Pollut. Res. 2014. V. 21. P. 10696.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3005-6>
23. Доус Э. Количественные проблемы биохимии (учебное пособие). Москва: Мир, 1983. 373 с.
 24. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
 25. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. Москва: Издательство МГУ, 1982. 345 с.
 26. Pujari D.S., Chanda S.V. Effect of salinity stress on growth, peroxidase and IAA oxidase activities in vigna seedlings // Acta Physiol. Plant. 2002. V. 24. P. 435.
<https://doi.org/10.1007/s11738-002-0040-6>
 27. Fang W.C., Kao C.N. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc // Plant Sci. 2000. V. 158. P. 71.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00307-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00307-1)
 28. Dubrovskaya E.V., Pozdnyakova N.N., Golubev S.N., Grinev V.S., Turkovskaya O.V. Peroxidases from alfalfa roots: Catalytic properties and participation in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. С. 174.
<https://doi.org/10.1134/S1021443717010058>
 29. Позднякова Н.Н., Никифорова С.В., Макаров О.Е., Турковская О.В. Влияние полициклических ароматических углеводородов на продукцию лакказы грибом белой гнили *Pleurotus ostreatus* D1 // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 595.
 30. Шобанова И.А., Кащенко О.Н. Растительные пероксидазы в системе биотрансформации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) // Ксенобиотики и живые системы / Под ред. В.М. Юрина и др. Минск: Электронная библиотека БГУ, 2008. С. 157.
 31. Lyubun Y., Muratova A., Dubrovskaya E., Sungurtseva I., Turkovskaya O. Combined effects of cadmium and oil sludge on sorghum: growth, physiology, and contaminant removal // Environ. Sci. Pollut. Res. 2020. V. 27. P. 22720.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-08789-y>
 32. Красовский Г.Н., Жолдакова З.И., Зайцев Н.А., Харчевникова Н.В., Беляева Н.И., Одинцов Е.Е., Егорова Н.А., Курляндский Б.А., Первухина И.В., Кучеренко А.И. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. ГН 2.1.5.1315-03. Москва: Минздрав России, 2003. 214 с.
 33. Дубровская Е.В., Шапошникова Т.С. Характеристика анионных внутриклеточных пероксидаз сорго веничного // Научное творчество XXI века / Под ред. Я.М. Максимова. Красноярск: Научно-инновационный центр, 2012. С. 432.
 34. Захарова Г.С., Упоров И.В., Тишков В.И. Пероксидаза из корней хрена: модулирование свойств химической модификацией белковой глобулы и гема // Успехи биол. химии. 2011. Т. 51. С. 37.
 35. Tomilin M.V., Olyunina L.N., Veselov A.P. Light dependent changes in peroxidase activity and peroxide hydrogen generation in the wheat seedlings // J. Stress Physiol. Biochem. 2011. V. 7. P. 5.
 36. Селегин И.В. Распределение тяжелых металлов в растениях и их действие на рост: Дис. ... докт. биол. наук. Москва: ИФР РАН, 2009. 424 с.
 37. Jouili H., Bouazizi H., El Ferjani E. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 6. P. 2075.
<https://doi.org/10.1007/s11738-011-0780-2>
 38. Квеситадзе Г.И., Хатисашвили Г.А., Садунишвили Т.А., Евстигнеева З.Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. Москва: Наука, 2005. 199 с.
 39. Wojes H.K., Pope P.G. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2007. V. 47. P. 288.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.11.007>
 40. Molina L., Segura A. Biochemical and metabolic plant responses toward polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals present in atmospheric pollution // Plants. 2021. V. 10. P. 2305.
<https://doi.org/10.3390/plants10112305>

УДК 581.1

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ КАЛЛУСОВ И НАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ СОЛОДКИ

© 2024 г. А. А. Ермошин^{a,*}, И. С. Киселёва^a, Б. А. Галишев^a, М. В. Улитко^a^aУральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

*e-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023 г.

После доработки 21.12.2023 г.

Принята к публикации 22.01.2024 г.

Корень солодки традиционно используется в медицине благодаря содержанию в нем сапонинов и флавоноидов. Листья солодки в качестве фармакопейного сырья не используются, хотя в последнее время ведется изучение их химического состава и биологической активности, что позволяет оценить возможности использования этого сырья как лекарственного. Активный сбор солодки может поставить под угрозу ее естественные популяции, поэтому актуальной задачей является культивирование клеток этого растения в системах *in vitro* и изучение состава метаболитов культур клеток. В нашем исследовании материалом для получения каллусной культуры листьев солодки были растения из коллекции Ботанического сада Уральского Отделения РАН. Для подбора оптимальных условий выращивания каллусов проведено сравнение 9 комбинаций фитогормонов. Лучший рост каллусов был обнаружен на среде Мурасиге-Скуга с сочетанием фитогормонов 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК. В этих условиях флавоноиды накапливались в каллусе в количестве, сопоставимом с их содержанием в интактных листьях и корнях. Содержание фенольных соединений было сравнимо с их количеством в корнях. Этанольные экстракты, полученные из каллусной культуры, обладали выраженной антиоксидантной активностью, сравнимой с экстрактами из интактного растения и стандартами рутином, галловой и аскорбиновой кислотами. При оценке влияния экстрактов на культуры животных клеток в МТТ-тесте показано, что все полученные экстракты повышали метаболическую активность как нормальных клеток человека, так и линии HeLa. При этом экстракт, полученный из листьев, проявлял максимальный эффект, а из каллуса – минимальный и незначительно отличался от экстракта корня. Таким образом, каллусы из листовых эксплантов могут рассматриваться как новое сырье для получения БАД с антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: *Glycyrrhiza glabra*, антиоксиданты, каллусная культура, фенольные соединения, ABTS-тест, МТТ-тест, NO

DOI: 10.31857/S0015330324010167, **EDN:** NUXORS

ВВЕДЕНИЕ

Солодка (*Glycyrrhiza glabra* L.) – многолетнее растение из семейства бобовых. Корни солодки с древнейших времен используются в официальной и народной медицине многих стран. Их экстракты применяют, главным образом, как отхаркивающее средство, а также для коррекции вкуса галеновых препаратов и как вспомогательное средство, облегчающее проникновение других активных веществ в ткани человека при приеме лекарственных препаратов. Кроме того, из солодки получены препараты, показавшие противовоспалительную (глицерритиновая кислота) и антибактериальную (глицерритиновая кислота и флавоноиды) активность, а также противоопухолевую и ряд других биологических активностей [1]. Важными биологически активными веществами корня солодки, обуславливающими

эту активность, являются сапонины [1], флавоноиды и полисахариды [2].

Несмотря на длительное применение солодки в медицине, изучение ее химического состава и биологической активности продолжается в настоящее время. Показано, что корень содержит от 22 до 44% экстрактивных веществ [3]. Основными действующими веществами корня и корневищ солодки являются производные тритерпенов (7.3–23.6%), в том числе стероидов (1.5–2%). Сопутствующие вещества – углеводы (18–34%), липиды (0.2–4.7%), смолы (1.7–4.1%), белки (6.2–10.1%) [4]. Кроме того, показана высокая биологическая активность экстрактов солодки и специфичность состава фенольных соединений, в частности флавоноидов, содержание которых составляет 3–4% от сухой массы [4, 5].

К сапонидам солодки относят 18- β -глицеретиновую кислоту и ее тритерпеновый гликозид – глицерризовую кислоту. Для этих соединений была показана гепатопротекторная функция, позитивное действие на ткани головного мозга при ишемии, противовоспалительный эффект при вирусных и бактериальных инвазиях, ингибирование репликации вирусов, в частности ВИЧ-1, Эпштейн-Барра, гепатита В [6] и COVID-19 [7].

Среди флавоноидов солодки обнаружены кверцетин, изофлавонон глабридин, халконы изоликвиригенин и ликуразид, ряд других соединений [5, 8]. Эти вещества подавляют образование активных форм кислорода (АФК), прерывают цепь свободнорадикальных реакций, снижают ответ макрофагов при воспалительных процессах [8].

Помимо прочего, для водных и спиртовых экстрактов солодки показаны положительные эффекты при бронхиальной астме, онкологических заболеваниях, а также иммуномодулирующее и противодиабетическое действие [9, 10].

Активный сбор солодки для нужд медицины и пищевой промышленности привел к истощению ее природных запасов и уменьшению генетического разнообразия в популяциях этого вида растений. В ряде регионов РФ и стран ближнего зарубежья солодка голая находится на грани истребления и занесена в региональные Красные книги (Курганской, Калужской, Самарской, Саратовской областей, республики Крым, Болгарии, Украины) (https://ozonit.ru/krasnaya_kniga/krasnaya_kniga_lekarstvennih_rastenii.php). Это определяет важность введения этого вида в культуру клеток и тканей и биотехнологического воспроизводства сырья с целью сохранения природных популяций.

Следует отметить, что надземная часть растения солодки изучена в меньшей степени, чем корни и корневища, и в официальной медицине не используются. Тем не менее, листья солодки характеризуются разнообразием флавоноидов. В экспериментах *in vitro* показана противораковая и противовирусная активность этих соединений [11]. Флавоноиды и фенольные соединения известны как антиоксиданты, которые участвуют в гашении АФК и NO-радикалов. Это определяет возможность их использования для создания новых БАД и функциональных продуктов.

В обзоре Аммосова и др. [5] проведено подробное сравнение состава различных групп фенольных соединений в корнях, надземной массе и каллусных культурах солодки. Показано, что кроме общих для корней и надземной биомассы фенольных соединений, у солодки имеются специфические для разных органов вещества. В целом, сведений по составу фенольных сое-

динений в каллусной культуре крайне мало, что определило наш интерес к этому вопросу.

Считается, что для индукции каллусогенеза важен эпигенетический профиль исходного экспланта. Так, для синтеза сапонинов в культуре солодки рекомендуется в качестве первичного экспланта использовать фрагменты корня [12], хотя глицерризин потенциально может синтезироваться также в культуре клеток, индуцируемой из листовых эксплантов [12]. Однако авторы отмечали эту способность только у части полученных ими каллусов, а также указывали на низкий уровень синтеза сапонинов, состав фенольных соединений не был изучен.

В нашем исследовании в качестве исходного материала для получения каллусных культур были выбраны листья солодки. Такой выбор обусловлен тем, что химический состав и биологическая активность экстрактов каллусов, полученных из листьев, изучены в меньшей степени, чем биологически активные соединения корней и полученных из них экстрактов. Кроме того, листья являются более удобным объектом для введения в культуру клеток, так как они более доступны для исследований (не требуется извлекать растение из почвы), и в листьях обычно внутренняя инфекция меньше, чем в подземных органах.

В связи с вышесказанным целью нашей работы было получение каллусной культуры листьев солодки голой, характеристика спектра фенольных соединений в полученных из нее экстрактах, определение их антиоксидантной активности *in vitro*, а также изучение влияния экстрактов из каллуса и интактных растений на культуры нормальных и раковых клеток человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Введение растительного материала в культуру

Каллусную культуру получали из эксплантов листьев солодки *Glycyrrhiza glabra* L., культивируемой в Ботаническом саду УрО РАН (Екатеринбург). Материал был предоставлен А.Ю. Беляевым, лаборатория молекулярной экологии растений ИЭРиЖ УрО РАН. Исходные растения солодки были интродуцированы из природных популяций Южного Урала.

Растительный материал стерилизовали по стандартной методике: 70% этанолом (1 мин) и гипохлоритом натрия (0.2% активного хлора, 15 мин), после чего 4 раза отмывали стерильной дистиллированной водой. Каллусы индуцировали в темноте на МС-среде с 3% сахарозой (pH 5.8 перед автоклавированием и внесением фитогормонов) с добавлением 1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 10 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК). Показано, что такое сочетание фитогор-

монов эффективно для каллусогенеза корневых эксплантов солодки [13]. Для подбора комбинации фитогормонов, обеспечивающей наиболее интенсивный рост и высокую выживаемость каллусов, первичные каллусы пассировали на 9 вариантах сред, содержащих БАП в концентрации: 0.2, 1.0, 5 мг/л и НУК в концентрации – 2, 10, 20 мг/л. Эксперимент закладывали трижды по две чашки Петри на каждый вариант опыта, 20–30 каллусов на чашку. Через 4 недели проводили описание каллусной культуры, визуально оценивали цвет, прирост сырой биомассы культуры определяли гравиметрически. Подсчитывали число растущих и погибших (потемневших и остановившихся в росте) каллусов. Результат выражали в процентах (%) выживших от общего числа каллусов.

Получение экстрактов

Для получения экстрактов использовали корни солодки, выращенной в Ботаническом саду (материал собран в июне со здоровых вегетирующих растений, не вступивших в фазу цветения). Клоны растений, взятых для сбора корней, выращивали в почве, отобранной в ботаническом саду УрО РАН, в лабораторных условиях в сосудах объемом 0.5 л. У этих растений для анализа химического состава и для получения эксплантов отбирали листья среднего яруса, как наиболее функционально активные. Это позволило круглогодично получать материал для анализа и индукции листовых эксплантов.

Для экстракции фенольных соединений из каллусной культуры, нативных листьев и корней солодки применяли 95% этанол. Для получения экстрактов использовали 0.2 г сухой биомассы биологического материала, представляющего усредненную пробу листьев или корней трех растений и 20 каллусов. Соотношение биомассы и растворителя 1 : 10 (масса : объем). Экстракцию проводили трехкратно. Каждый раунд экстракции имел продолжительность 40 мин при температуре 50°C, периодическом помешивании и постоянной обработке ультразвуком. Экстракты объединяли, доводили до определенного объема, что соответствовало 20 мг сухого вещества на 1 мл готового экстракта.

Биохимические исследования и in vitro антиоксидантная активность

В экстрактах спектрофотометрически определяли содержание суммы фенольных соединений (с 0.1 М реактивом Фолина-Чикольтеу и 7.5% карбонатом натрия, при длине волны 760 нм) и флавоноидов (с 2% спиртовым раствором хлорида алюминия, при длине волны 420 нм) [14]. Методика была модифицирована для полумикроанализа – объем реагентов и

пробы был уменьшен пропорционально, что бы общий объем реакционной смеси составлял 0.2 мл для проведения анализа в 96-луночных планшетах. Калибровочные кривые готовили, соответственно, по галловой кислоте и рутину. Содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов выражали в мг/г сухой биомассы, в пересчете на галловую кислоту и рутин соответственно.

Антиоксидантную и антирадикальную активность экстрактов *in vitro* определяли по ингибированию образования окрашенного АБТС-радикала [14], подавлению образования оксида азота (высокоактивного свободного радикала) в реакции с нитропруссидом натрия и реактивом Грисса, а также по общему восстановительному потенциалу – образованию молибденовой сини [15]. В качестве образцов сравнения использовали рутин, галловую и аскорбиновую кислоту в концентрации 0.5 мг/мл. Все использованные в работе реактивы квалификации чда или хч. Стандарты для калибровочных графиков и образцы сравнения производства Merk (Германия). Измерение проводили на микропланшетном спектрофотометре Infinite M200 Pro (“Tecan”, Австрия). При определении антиоксидантной активности все расчеты проводили относительно отрицательного контроля – реакционной смеси, в которую был добавлен этанол (экстрагент) в том же объеме, что и экстракт в опытных пробах, таким образом, во всех методах антиоксидантная активность контрольного образца равнялась 0%, а опытные образцы и растворы стандартов (положительный контроль) сравнивались с ним.

Тестирование биологической активности на культуре клеток человека in vitro

Метаболическую активность культуры дермальных фибробластов человека, выделенных в Институте медицинских клеточных технологий (Екатеринбург) и карциномы шейки матки человека линии HeLa, полученной из коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук определяли по стандартной методике по образованию формазана в МТТ-тесте после 48 ч инкубирования культуры совместно с экстрактами (5% от объема среды культивирования) [16]. Все операции, связанные с инкубированием клеток проводили в стерильных условиях в ламинарном боксе БАВ-нп-01-“Ламинар-С”-1,2 LORICA (“Ламинар Системс”, Россия). Клетки культивировали до образования монослоя в CO₂ инкубаторе Sanyo (“Panasonic”, Япония) MCO-18AC при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂, 95% влажности с использованием питательной среды Игла DMEM (“Биолот”, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Биолот”,

Россия) и пенициллин-стрептомицина (“Биолот”, Россия).

Оптическую плотность раствора формазана измеряли на микропланшетном спектрофотометре Infinite M200 Pro (“Tecan”, Австрия) при длине волны 570 нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Перед хроматографическим разделением 1 мл этанольного экстракта, полученного как описано ранее, пропускали через предколонку с модифицированным С-18 сорбентом для удаления прочно связывающихся с ним веществ. Первые 0.8 мл экстракта отбрасывали, оставшиеся 0.2 мл пропускали через микрофильтр с размером пор 0.22 мкм, для удаления микрочастиц. Полученный образец использовали для ВЭЖХ.

Анализ проводили на хроматографе Waters Aquity UPLC (“Waters”, США), с гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (“Waters”, США). Пробу в объеме 3 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) (“Waters”, США). Температура колонки – 40°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. Подвижная фаза – 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. Состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0–23 мин – 5→60%, 23–23.5 мин – 60→95%, 23.5–25.0 мин – 95%, 25.0–25.5 мин – 95→5%, 25.5–27.0 мин – 5%. Анализ осуществляли в режиме отрицательной ионизации. Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 120°C, температура десольвации – 350°C, напряжение на капилляре – 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота 750 л/час. Индивидуальные фенольные соединения и флавоноиды определяли, сопоставляя время удержания и молекулярную массу характеристического иона со стандартами.

Статистическая оценка результатов

Определение содержания фенольных соединений, антиоксидантной и метаболической активности экстрактов проводили в 4–5 повторностях. Достоверность различий определяли по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни с использованием программных пакетов Statistica 10 и MS Excel 2010. На рисунках и в таблицах представлены средние значения измеряемых параметров и ошибка среднего. Разными буквами обозначены различающиеся варианты ($P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подбор оптимального сочетания фитогормонов для роста каллусов

Все варианты сред, содержащих БАП в концентрации 5 мг/л не зависимо от концентрации НУК в среде, вызывали гибель каллусов (табл. 1). На средах с 0.2 мг/л БАП выживаемость каллусов варьировала от 16 до 100% в зависимости от содержания НУК, а на средах с 1 мг/л БАП – от 87 до 100% при разных концентрациях НУК. При этом при добавлении в среду 2 мг/л НУК каллусы при всех использованных концентрациях БАП росли медленнее, быстрее старели, что выражалось в их потемнении. С ростом количества НУК каллусы становились более светлыми. При внесении 10 мг/л НУК в среду каллусы были окрашены в светло-коричневый цвет, тогда как при 20 мг/л – в желтый (рис. 1).

Лучший рост каллусов наблюдали в вариантах 1 мг/л БАП и 10 или 20 мг/л НУК. При таком соотношении фитогормонов в среде прирост каллусов на третью неделю пассирования сохранялся на том же уровне. Индекс роста каллусов для этих сочетаний фитогормонов существенно не отличался и составлял от 3.5 до 4.5. Это больше, чем, например, в варианте с той же концентрацией БАП (1 мг/л), но меньшей концентрацией НУК (2 мг/л), где индекс роста каллусов составлял около 2.7.

Содержание фенольных соединений

В экстрактах, полученных из каллусов, выращенных на средах с двумя выбранными комбинациями фитогормонов, определяли суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов. Полученные результаты пересчитывали на единицу сухой массы материала. Поскольку корни традиционно применяются в медицине, их рассматривали как образец сравнения.

Таблица 1. Выживаемость каллусов (%) на средах с различной комбинацией фитогормонов

		Нафтилуксусная кислота, мг/л		
		2	10	20
Бензиламинопурип, мг/л	0.2	16	73	100
	1	87	87	100
	5	0	0	0

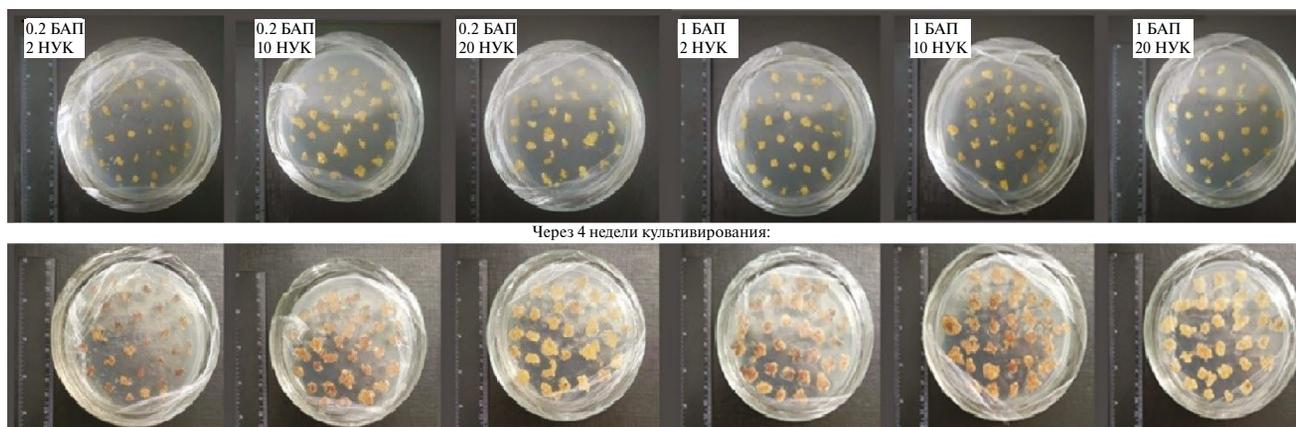


Рис. 1. Рост каллусов через месяц культивирования. БАП – бензиламинопурин (мг/л); НУК – нафтилуксусная кислота (мг/л).

Показано, что экстракты из нативных листьев солодки наиболее богаты фенольными соединениями (29.7 мг/г) в сравнении с каллусами из листовых эксплантов (1.9–4.5 мг/г) и корнями (3.6 мг/г) (рис. 2а). Однако по общему содержанию фенольных веществ каллусные культуры были сопоставимы с экстрактами из корней, которые являются сырьем для получения лекарственных препаратов. В то же время, с увеличением концентрации ауксинов в среде культивирования содержание фенольных соединений заметно снижалось (в 2.5 раза).

Суммарное содержание флавоноидов различалось в трех типах экстрактов. В корнях оно было выше (14.5 мг/г), чем в надземных органах

(10.0 мг/г), а в каллусах меньше, чем в корнях и листьях (3.4–7.1 мг/г) (рис. 2б).

Известно, что фенольные соединения и флавоноиды являются мощными антиоксидантами, поэтому было важно сравнить антиоксидантную активность экстрактов.

Флавоноиды относятся к фенольным соединениям, однако в ряде случаев их содержание в образце превышало суммарное количество фенольных соединений. Это можно объяснить тем, что суммарную концентрацию фенольных соединений и флавоноидов определяли в расчете на разные соединения (галловую кислоту или рутин соответственно), что было указано в методах.

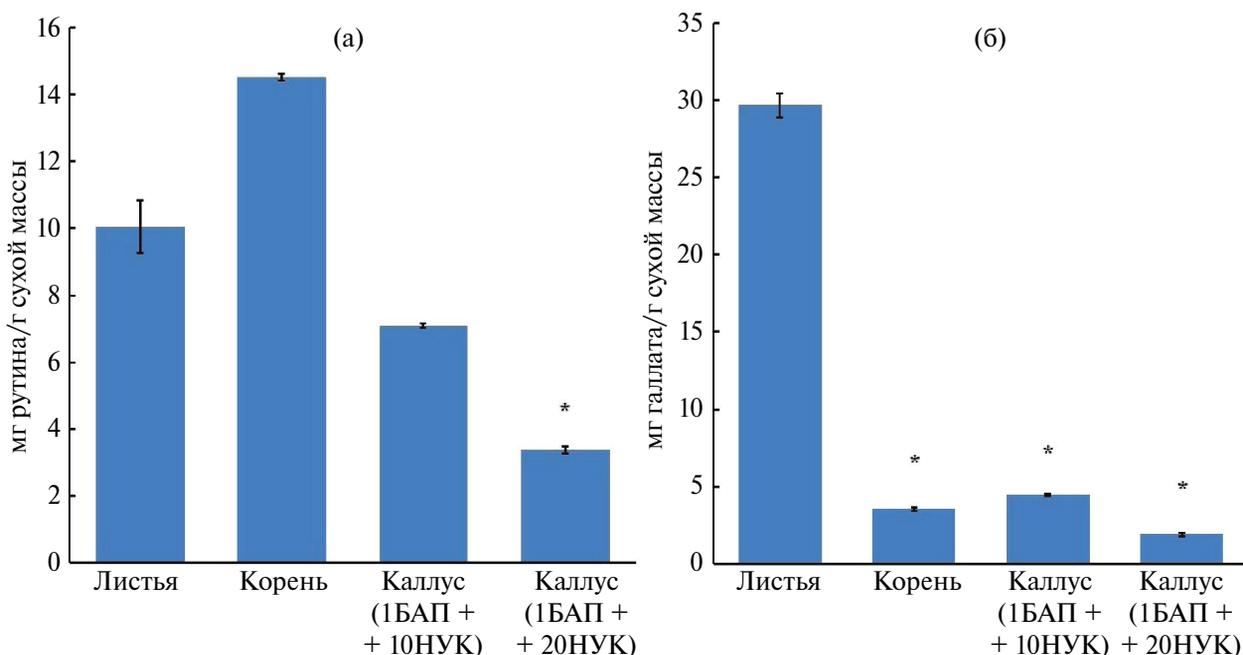


Рис. 2. (а) – Содержание суммы фенольных соединений (в пересчете на галловую кислоту) и (б) – флавоноидов (в пересчете на рутин) в интактных растениях и каллусных культурах. * – отличия от листа при $P < 0.05$. Достоверных отличий между другими вариантами не выявлено.

In vitro показатели антиоксидантной активности экстрактов

Антиоксидантная активность, выраженная как общая восстановительная способность, в 2–3 раза была выше в листьях, чем в корнях и каллусах (табл. 2). По этому показателю экстракты каллуса были сходны с экстрактами корней, но не листьев. В экстрактах каллуса, выращенного с добавлением 1 мг/г БАП и 10 мг/г НУК, эта активность была выше, чем в случае с 1 мг/г БАП и 20 мг/г НУК. Однако восстановительная активность соединений не всегда коррелирует с их способностью ингибировать образование радикалов. Экстракты каллусов, полученные при разных концентрациях НУК, не отличались от экстракта корней и несколько превосходили экстракт листьев по способности ингибировать образование АБТС-радикала. При этом каллусные культуры уступали как листьям, так и корням по способности ингибировать образование оксида азота.

Состав индивидуальных фенольных соединений

Каллусную культуру, растущую на среде с 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК, показавшую лучший рост и синтез фенольных соединений, использовали для ВЭЖХ-МС анализа. В качестве образца сравнения использовали экстракт корня. Анализ показал, что галловая, салициловая, сиреневая, ванилиновая кислоты, ресвератрол, катехин, кверцетин и флороглюцин отсутствовали как в каллусной культуре, так и в корне. В корне был обнаружен рутин, но он не был найден в каллусной культуре. В обоих исследованных образцах присутствовала *p*-кумаровая кислота, тогда как феруловая кислота – только в каллусе (рис. 3).

Влияние экстрактов на метаболическую активность культивируемых клеток

Для изучения биологической активности экстрактов солодки использовали только экстракты каллусной культуры, полученной на среде с 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК. Для тестов использовали культуру фибробластов и клеток HeLa.

Метаболическую активность культивируемых клеток человека выявляли в МТТ-тесте, отражающем активность дыхательных ферментов [16]. Показано, что добавление экстрактов существенно повышает метаболическую активность как нормальных, так и патологических клеток. При этом стимулирование активности было выше в культуре фибробластов, чем в линии опухолевых клеток. Наибольший стимулирующий эффект оказывали экстракты, полученные из листа, а наименьший – экстракты каллусов. В данном тесте эффект, оказываемый экстрактами каллуса, был схож с эффектом экстракта корня, но не листа (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения каллусов из листьев солодки было испытано действие разных сочетаний фитогормонов. Наибольшая доля выживших каллусов обнаружена при добавлении в среду 10 и 20 мг/л НУК (табл. 1) при содержании в среде 1 или 0.2 мг/л БАП. При этом снижение концентрации БАП с 1 до 0.2 мг/л существенно не влияло на выживаемость культуры, однако ускоряло ее старение и вызывало потемнение каллусов. Полученный результат согласуется с известным эффектом замедления старения органов и тканей растений цитокининами [17]. Это также может быть связано с уменьшением синтеза фенольных соединений, которые при окисле-

Таблица 2. Показатели *in vitro* антиоксидантной активности

Образец	Восстановительный потенциал, %	Ингибирование АБТС-радикала, %	Подавление продукции NO, %
Листья	1160 ± 91*	84.5 ± 10	38 ± 3
Корень	550 ± 30 ^x	92.8 ± 0.1	37 ± 3
Каллус (БАП 1 мг/л + НУК 10 мг/л)	585 ± 31 ^x	91.9 ± 0.1	17 ± 2 ^{*x}
Каллус (БАП 1 мг/л + НУК 20 мг/л)	340 ± 20 ^{*x}	92.7 ± 0.2	22 ± 2 ^{*x}
Аскорбиновая кислота, 0.5 мг/мл	255 ± 12 ^{*x}	0.0 ± 0.0 ^{*x}	24 ± 1 ^{*x}
Галловая кислота, 0.5 мг/мл	359 ± 10 ^{*x}	93.4 ± 0.1	36 ± 10
Рутин, 0.5 мг/мл	113 ± 9 ^{*x}	71.2 ± 2.3*	0 ± 0 ^{*x}

Примечание: ^x – отличия от листа достоверны при $P < 0.05$; * – отличия от корня достоверны при $P < 0.05$.

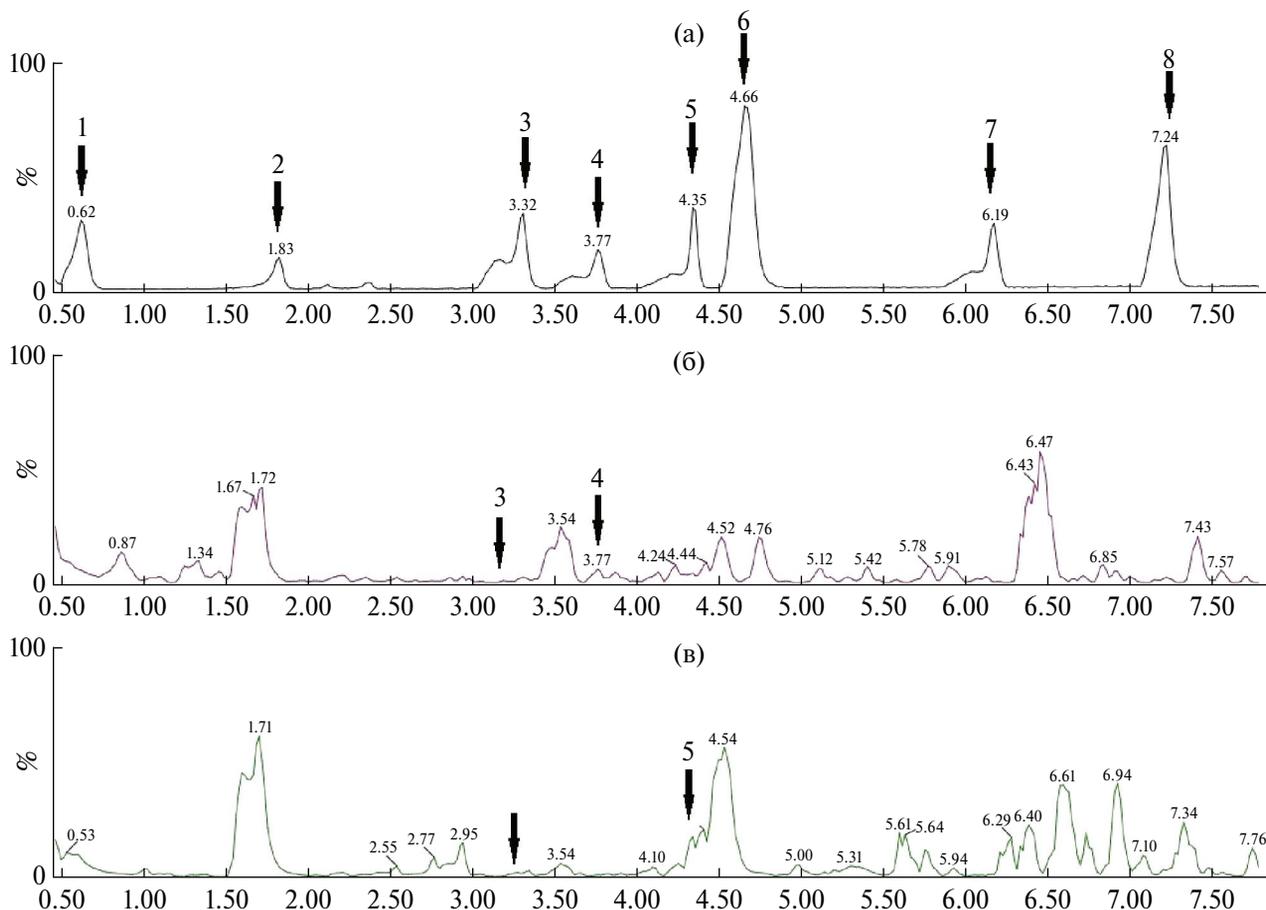


Рис. 3. Хроматограмма смеси стандартов (а), экстракта, полученного из каллуса (б) и из корня (в) солодки. 1 – галловая кислота; 2 – катехин; 3 – *p*-кумаровая кислота; 4 – феруловая кислота; 5 – рутин; 6 – салициловая кислота; 7 – ресвератрол; 8 – кверцетин.

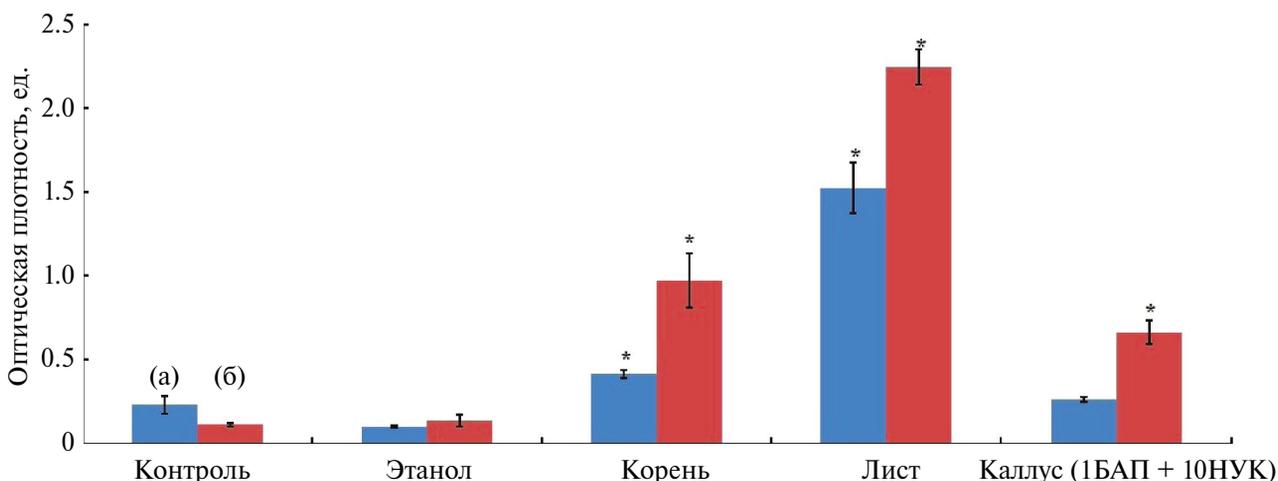


Рис. 4. Метаболическая активность клеточной линии HeLa (а) и культивируемых фибробластов человека (б). * – отличия от контроля и от этанола достоверны при $P < 0.05$. Варианты “контроль” и “этанол” между собой достоверно не различаются.

нии превращаются в хиноны или с увеличением оводненности каллуса при росте концентрации ауксинов. По нашим данным увеличение концентрации НУК в среде культивирования приводило к заметному снижению содержания фенольных соединений.

Сравнение полученных данных с результатами других исследователей [12] показало, что более низкие концентрации НУК при таких же действующих концентрациях БАП вызывают образование каллуса с такой же частотой. При этом в каллусах наблюдали обра-

зование побегов с частотой от 15 до 50%, что мы считаем нежелательным явлением при получении каллусных культур, являющихся продуцентами БАВ.

Использование более сложных сочетаний фитогормонов (кинетин или БАП, НУК, ИУК (индолилуксусная кислота) или 2,4-Д) [18] при индуцировании каллуса из корней солодки показало, что при одновременном внесении БАП и ИУК каллус не образовывался, а при 0.5 мг/л НУК, 0.5 мг/л ИУК и 1 мг/мл кинетина частота каллусогенеза была ниже, чем в подобранных нами сочетаниях фитогормонов.

Было показано [12], что в каллусах листовых и стеблевых эксплантов солодки синтезировался глицерризин. В полученных нами каллусах не было определено содержание тритерпеновых сапонинов, но на основе литературных данных [12], можно предположить, что они также способны синтезировать глицерризин. Накопление сапонинов [18] было также обнаружено при старении каллусов, при этом изменение содержания суммы фенольных соединений и флавоноидов с увеличением возраста культуры происходило нелинейно и не столь драматично как глицерризиновой кислоты [18].

Сопоставление содержания фенольных соединений в каллусах, полученных нами из листовых эксплантов с каллусами из корней [18] показало, что этих соединений в них было примерно в 1.5 раза меньше, а флавоноидов столько же. При этом соотношение суммы фенольных соединений к сумме флавоноидов в каллусах из листовых эксплантов было значительно меньше, чем в культуре, полученной из корней на среде с несколькими видами ауксинов.

По содержанию фенольных соединений и соотношению суммы фенольных веществ и флавоноидов экстракты каллусов из листьев солодки имели больше сходства с экстрактами нативных корней и корневищ. В сравнении с нативными листьями содержание суммы фенольных соединений в полученных нами каллусах было меньше, а флавоноидов такое же. С увеличением концентрации НУК в среде культивирования каллусов содержание этих метаболитов снижалось (рис. 2).

С накоплением фенольных соединений и флавоноидов связывают биологическую активность экстрактов корней и листьев солодки. Так, Vlasisavljević с соавт. и Frattaruolo с соавт. [19, 20] показали антиоксидантную активность этих экстрактов. Такие же свойства показали экстракты каллусов, полученные нами из листовых эксплантов. Их антиоксидантная активность в тестах *in vitro* была сопоставима с антиоксидантной активностью экстракта из интактных корней. Увеличение концентрации НУК в среде культивирования каллусов не оказывало суще-

ственного влияния на антиоксидантную активность экстрактов, полученных из них, хотя негативно сказывалось на содержании фенольных метаболитов (табл. 2).

Показано, что флавоноиды солодки способны проявлять противовоспалительную [20] и противораковую активность *in vitro*, например, подавлять рост клеточной линии аденокарциномы и рака яичника [19]. Авторы указанного исследования обнаружили в экстракте корней солодки такие флавоноиды как апигенин, нарингинин, кемпферол, эпикатехин, катехин, рутин, кверцетин и другие. Были также найдены изофлавоноиды, лигнаны, кумарины, а также протокатеховая, *p*-кумаровая, *o*-кумаровая, ванилиновая, феруловая, хлорогеновая, кофейная, коричная, галловая кислоты. Однако в сумме содержание всех этих соединений составляло меньше половины от суммарного содержания фенольных соединений, определенных спектрофотометрическим методом в листьях солодки.

В нашем исследовании биологическая активность экстрактов солодки была проверена на культуре фибробластов человека и опухолевой клеточной линии HeLa (рис. 3). Для тестирования использовали экстракт корневища, листьев и каллуса, полученного на МС-среде с добавлением 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК. Было показано, что экстракт интактного листа вызывает наибольшее повышение метаболической активности нормальных и патологических клеток в МТТ-тесте. Важно, что экстракты корневища и листа стимулировали рост как нормальных, так и патологических клеток, тогда как экстракт, полученный из каллусной культуры – стимулировал метаболическую активность только нормальных клеток, тогда как в опухолевых клетках этот показатель не отличался от контрольного варианта. Клеточные культуры HeLa – один из самых распространенных, но далеко не единственный тестовый объект для изучения противораковой активности биологически активных соединений природного и синтетического происхождения. В работе [19] противоопухолевая активность экстрактов солодки также была обнаружена.

Таким образом, дальнейшее изучение биологической активности экстрактов каллуса солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.) из разных эксплантов может вызывать интерес в связи с возможностью получения перспективного сырья для получения антиоксидантных и противораковых препаратов.

ВЫВОДЫ

Подобраны оптимальные условия культивирования каллусов солодки, индуцированных из листовых эксплантов: МС-среда с 3% сахарозой и комбинацией фитогормонов – БАП

(1 мг/л) и НУК (10 мг/л). Увеличение концентрации БАП в среде вызывало снижение жизнеспособности каллусов, а повышение уровня НУК уменьшало содержание вторичных метаболитов и антиоксидантные свойства экстрактов из каллусов.

Каллусные культуры значительно уступали интактным листьям по сумме фенольных соединений, а содержание флавоноидов практически не различалось. По содержанию фенольных веществ и соотношению количества фенольных соединений к флавоноидам, каллусы, полученные из листовых эксплантов, сравнимы с нативными корнями. Экстракты из каллусов листьев солодки демонстрировали такие же антиоксидантные свойства, что и экстракты корней и типичных антиоксидантов – аскорбиновой и галловой кислот и рутина.

Экстракты корней солодки, ее листьев и каллусов, полученных на их основе, стимулировали метаболическую активность нормальных (фибробласты) и опухолевых (HeLa) линий клеток человека, причем экстракт каллуса в меньшей степени стимулировал раковые клетки, чем нормальные.

Таким образом, каллусная культура солодки, полученная из листьев, может стать новым перспективным сырьем для синтеза вторичных метаболитов, в частности флавоноидов, обладающих высоким антиоксидантным потенциалом. Культивирование каллусов солодки *in vitro* позволит сократить сбор растений в природе и восстановить естественную численность популяции этого вида.

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. Ding Y., Brand E., Wang W., Zhao Z. Licorice: Resources, applications in ancient and modern times // *J. Ethnopharmac.* 2022. V. 15. P. 298:115594. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115594>
2. Pastorino G., Cornara L. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review // *Phytother Res.* 2018. V. 2. P. 2323. <http://doi.org/10.1002/ptr.6178>
3. Рыбальченко А.С., Голицын В.П., Комарова Л.Ф. Исследование экстракции солодкового корня // *Химия растительного сырья.* 2002. Т. 4. С. 55.
4. Hosseinzadeh H., Nassiri-Asl M. Pharmacological effects of *Glycyrrhiza* spp. and its bioactive constituents: update and review // *Phytother Res.* 2015. V. 12. P. 1868.
5. Ammosov A., Litvinenko V. Phenolic compounds of the general *Glycyrrhiza* L. and *Meristotropis* Fisch. et Mey. (review) // *Pharmaceutical Chem. J.* 2007. V. 41. P. 372. <http://doi.org/10.1007/s11094-007-0084-4>
6. Kao T.C., Wu C.H., Yen G.C. Bioactivity and potential health benefits of licorice // *J. Agricult. Food Chem.* 2014. V. 62. P. 542. <http://doi.org/10.1021/jf404939f>
7. Zhang Q., Huang H., Qiu M., Wu Z., Xin Z., Cai X., Shang Q., Lin J., Zhang D., Han L. Traditional uses, pharmacological effects, and molecular mechanisms of licorice in potential therapy of COVID19 // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 719758. <http://doi.org/10.3389/fphar.2021.719758>
8. Wahab S., Annadurai S., Abullais S., Das G., Ahmad W., Ahmad M., Kandasamy G., Vasudevan R., Ali M., Amir M. *Glycyrrhiza glabra* (Licorice): A comprehensive review on its phytochemistry, biological activities, clinical evidence and toxicology // *Plants.* 2021. V. 10. P. 2751. <https://doi.org/10.3390/plants10122751>
9. Mamedov N., Egamberdieva D. Phytochemical constituents and pharmacological effects of licorice: A review // *Plant Human Health.* 2019. V. 3. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04408-4_1
10. Deeksha S., Priyanka N., Priti S. Phytochemistry and pharmacological studies of *glycyrrhiza glabra*: A medicinal plant review // *Inter. J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res.* 2021. V. 67. P. 187. <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v67i01.030>
11. Yang R., Wang L.Q., Yuan B.C., Liu Y. The pharmacological activities of licorice // *Planta Medica.* 2015. V. 81. P. 1654. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1557893>
12. Wongwicha W., Tanaka H., Shoyama Y., Tuvshintogtokh I., Putalun W. Production of glycyrrhizin in callus cultures of licorice // *Zeitschrift fur Naturforschung C.* 2008. V. 63. P. 413. <https://doi.org/10.1515/znc-2008-5-617>
13. Юшков Е.В., Мусеева Т.В., Величко Н.А., Пеня С.М. РФ Патент 2123255, 1998.
14. Larayetan R., Ololadem Z., Ogunmola O., Ladokun A. Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxicity, antimicrobial, antitrypanosomal, and antimalarial potentials of the crude extracts of *Callusesstemon citrinus* // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2019. 5410923. <https://doi.org/10.1155/2019/5410923>
15. Umamaheswari M., Chatterjee T.K. In vitro antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract // *Afr. J. Tradit. Compliment Med.* 2008. V. 5. P. 61.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunolog. Meth.* 1986. V. 65. P. 55.
17. Romanov G. How do cytokinins affect the cell? // *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 268. <https://doi.org/10.1134/S1021443709020174>
18. Акулов А.Н., Костюкова Ю.А. Условия культивирования, гистологический и биохимический

- анализ каллусной культуры солодки *Glycyrrhiza glabra* L. // Цитология. 2021. Т. 63. С. 590.
<https://doi.org/10.31857/S004137712106002X>
19. *Vlaisavljević S., Šibul F., Izabella S., Zupko I., Ocsovszki I., Jovanovic-Santa S.* Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. // *Industrial Crops and Products*. 2018. V. 112. P. 217.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.050>
20. *Frattaruolo L., Carullo G., Brindisi M., Mazzotta S., Bellissimo L., Rago V., Curcio R., Dolce V., Aiello F., Cappello A.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) leaf phytocomplexes: identification of licoflavanone as a modulator of NF-κB/MAPK pathway // *Antioxidants*. 2019. V. 8. P. 186.
<https://doi.org/10.3390/antiox8060186>

УДК 581.1;543.42.062;543.422.3

ПРИМЕНЕНИЕ БРОМКРЕЗОЛОВОГО ЗЕЛЕНОГО ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АЛКАЛОИДОВ НА ПРИМЕРЕ РУТЫ ДУШИСТОЙ¹

© 2024 г. А. И. Валиева^{а,*}, А. Н. Акулов^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

*e-mail: cell-culture@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.09.2023 г.

После доработки 15.11.2023 г.

Принята к публикации 16.11.2023 г.

Были проведены исследования по подбору условий для спектрофотометрического определения общего содержания алкалоидов с помощью бромкрезолового зеленого (БКЗ): рН буфера, время образования ионной пары БКЗ–алкалоид и время стабильности ионной пары БКЗ–алкалоид. Показано, что метод применим для тропановых, изохинолиновых, индольных, пиридиновых алкалоидов. Метод был использован для экспресс-оценки содержания алкалоидов в биомассе растений-регенерантов Руты душистой (*Ruta graveolens* L.) и в аптечном препарате “Рута душистая трава”. При использовании минимального объема сухого растительного материала (20 мг) было определено, что содержание алкалоидов в растениях-регенерантах составило 10.55 мг/г сухого веса, что в 1.62 раза меньше, чем в образцах аптечного препарата. Методом обращенно-фазной ВЭЖХ в очищенных фракциях алкалоидов было выявлено 16 соединений разной интенсивности, из них 6 были общими для растений-регенерантов и для аптечного препарата.

Ключевые слова: *Ruta graveolens*, алкалоиды, бромкрезоловый зеленый, растения-регенеранты

DOI: 10.31857/S0015330324010171, EDN: NUUMWT

ВВЕДЕНИЕ

Определение содержания биологически активных веществ в растениях является необходимым как для понимания их роли в растительном организме, так и для безопасного практического использования растительных ресурсов. В медицине, ветеринарии и пищевой промышленности особенно критичным является точное определение содержания БАВ, способных проявить свое действие на организм человека и животных в микромолярных концентрациях. К таким веществам относится большинство алкалоидов, азотсодержащих органических соединений вторичного происхождения. Алкалоиды обладают свойствами слабых оснований и накапливаются в растениях в виде солей органических кислот. Из растительного материала соли алкалоидов извлекают с помощью полярных растворителей, очищают от примесей, затем подщелачивают, в результате чего алкалоиды переходят в

свободное состояние и становятся доступными для экстракции неполярными растворителями. Это свойство алкалоидов используют в таких аналитических методах определения содержания алкалоидов, как титрометрический и гравиметрический. Однако эти методы не подходят для рутинного анализа, поскольку трудоемки, требуют большого объема растительного материала и при этом имеют свои ограничения. В частности, титрометрический метод не годится для определения содержания алкалоидов со слабыми основными и/или амфотерными свойствами, а гравиметрический метод не подходит для определения содержания малых доз алкалоидов, а также содержания термолабильных алкалоидов.

Спектрофотометрические методы характеризуются высокой чувствительностью, поэтому их можно применять при малом объеме растительного материала, однако универсального реактива для определения содержания алкалоидов до сих пор не найдено. Разнородность групп алкалоидов по структуре и свойствам делает разработку единого спектрофотометрического метода определения общего содержания алкалоидов

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324010171

Сокращения: БКЗ – бромкрезоловый зеленый, опт.ед. – оптических единиц, УЗ – ультразвук.

затруднительной, но изучение роли алкалоидов невозможно без решения методологических проблем определения содержания алкалоидов, поэтому продолжается поиск простых, надежных методов для рутинного анализа.

В 1957 году для титрометрического определения содержания алкалоидов было предложено использовать кислотно-основные индикаторы из группы сульфоталеинов, поскольку они могут реагировать с третичными аминами с образованием окрашенных продуктов присоединения [1]. Thomis и Kotionis протестировали 8 индикаторов и заключили, что все они на один-два порядка чувствительнее, чем пикриновая кислота, реактивы Драгендорфа, Майера, Шейблера, традиционно используемые для качественного определения алкалоидов [1].

Позднее бромкрезоловый зеленый (БКЗ), один из сульфоталеинов, стали использовать для спектрофотометрического определения содержания алкалоидов [2]. Однако единый метод не был разработан. Например, все авторы отмечают, что максимальное поглощение ионной пары БКЗ–алкалоид находится в области 410–420 нм, при этом измерения проводят при разных аналитических длинах волн: при λ_{\max} [3–5], или же при 470 нм, на спаде поглощения ионной пары БКЗ–алкалоид [6].

В методиках, представленных в литературе, может различаться не только длина волны, выбранная для измерения оптической плотности, но также рН используемого буфера, время, отводимое для формирования комплекса. Несмотря на разные, часто противоречащие друг другу подходы, используемые в статьях, сам метод достаточно простой и недорогой, поэтому может быть перспективным и удобным как в качестве экспресс-теста перед применением более дорогостоящих и трудоемких методов анализа, так и в качестве самостоятельного анализа.

Рута душистая содержит алкалоиды разных классов – акридоновых, хинолиновых, фуорохинолиновых [7]. Они обладают антибактериальными [8, 9], противогрибковыми [10] и противовирусными свойствами [11], а также проявляют активность против простейших [10]. Выявлены антиканцерогенные свойства алкалоидов Руты душистой. Показано, что хинолиновый алкалоид гравеолин индуцирует апоптоз в клетках меланомы [12], фуорохинолиновые алкалоиды подавляют рост опухолевых клеток [10], акридоновые алкалоиды проявляют цитотоксический эффект, воздействуют на опухолевые клетки на регуляторном уровне, связываясь с топоизомеразами I и II, теломеразами, протеинкиназами [13]. В настоящее время изучаются механизмы действия алкалоидов Руты душистой и разрабатываются лекарства нового поколения для лечения рака [13].

Следует подчеркнуть, что акридоновые и фуорохинолиновые алкалоиды обнаружены только в растениях семейства Рутовые, а химический синтез сложных алкалоидов в большинстве случаев нерентабелен, при получении синтетических аналогов часто модифицируют природные алкалоиды, поэтому в фармакологии в качестве основного источника алкалоидов продолжают использовать растительный материал. Это могут быть растения, собранные в местах их естественного произрастания, растения, выращиваемые в промышленных масштабах, а также культура клеток и тканей *in vitro* и регенеранты растений, полученные из нее [14].

Рута душистая произрастает в субтропическом климате как многолетнее травянистое растение, в умеренных широтах культивируется как однолетнее растение и не всегда хорошо наращивает биомассу, однако этот вид легко вводится и поддерживается в культуре *in vitro*. Хотя состав алкалоидов Руты душистой известен хорошо, общее содержание алкалоидов в литературе широко не представлено. Целью данной работы было оптимизировать метод спектрофотометрического определения содержания алкалоидов, оценить его надежность; применить для определения содержания алкалоидов в растительном материале Руты душистой, выращенной в условиях *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы: 1 – аптечный препарат “Рута душистая трава” (ООО “Беловодье”, Россия), представлявший собой высушенную надземную часть растения (кусочки стеблей, листьев, соцветий), 2 – биомасса растений-регенерантов, полученных *in vitro* из морфогенной каллусной культуры Руты душистой (*Ruta graveolens* L.), способной к геммогенезу.

Для индукции роста растений-регенерантов, каллусную культуру Руты душистой переносили на свет на безгормональную МС-среду (МС_{6/г}) на основе минеральных компонентов среды Мурасиге-Скуга [15] с добавлением: 2.0 мг/л тиамина·HCl, 2.0 мг/л пиридоксина·HCl, 2.0 мг/л никотиновой кислоты, 100 мг/л мезоинозитола, 30 г/л сахарозы, 8 г/л агара, рН 5.6. Появившиеся зеленые побеги отделяли от каллуса и переносили в колбы со средой МС_{6/г} для получения новых побегов и оставляли на свету. Каждые 30 суток побеги отделяли и высаживали на свежую питательную среду.

Реактивы и аптечные препараты

Реактивы для приготовления среды МС_{6/г}, перечисленные выше, имеют маркировку A.C.S. grade, производства фирм “Serva” и “Sigma-Aldrich”.

Бромкрезоловый зеленый, кофеин (“Sigma-Aldrich”, A.C.S. grade), этанол, хлороформ, ацетонитрил, этилацетат, аммиак, ледяная уксусная кислота, муравьиная кислота (“Chemman Мос-реактив”, Россия, х.ч.), сахароза, йодид калия, нитрат висмута основной (“Реахим”, х.ч.).

Аптечные препараты: атропина сульфат (ФГУП “Московский эндокринологический завод”, Россия, 1 мг/мл), папаверина гидрохлорид (ОАО “Дальхимпром”, Россия, 20 мг/мл), никотин (“Enshi Heno”, Китай, 100 мг/мл, extra pure grade), Руты душистой трава (ООО “Беловодье”, Россия), Раунатин (ЗАО “Вифитех”, Россия), Сангвинаритрин (АО “Фармцентр Вилар”, Россия).

Приготовление растворов

Раствор 0.1 мМ БКЗ в хлороформе содержит: 1 мг БКЗ растворяли в 14 мл хлороформа.

Для получения 0.1 мМ атропина сульфат/папаверина гидрохлорид/никотин/кофеин в хлороформе необходимый объем алкалоида смешивали на вортексе (“Elmi”, Латвия) с 3 мл хлороформа: 6 мкл 2% папаверина гидрохлорида, 0.5 мкл 10% никотина, 1 мкл 6% кофеина, 205 мкл 0.1% атропина сульфата; при приготовлении атропина сульфата после смешивания с хлороформом дожидались разделения фаз и отбирали нижнюю хлороформную фазу.

Для получения 0.1 мМ водного раствора бромкрезолового зеленого (БКЗ): 7 мг БКЗ растворяли в 300 мкл 2N NaOH, добавляли 2 мл деионизированной воды MilliQ (“Millipore”, Италия) и затем доводили до 100 мл водой MilliQ.

Фосфатно-цитратный буфер (0.25 М) готовили так: к 50 мл 0.5 М Na_2HPO_4 добавляли 50 мл 0.2 М моногидрат лимонной кислоты, pH доводили до 4.7. В эксперименте по подбору pH буфера была использована серия 0.25 М фосфатно-цитратного буфера с pH 3.0, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 5.4.

Подготовка образцов и проведение спектрофотометрических измерений

Для получения спектров поглощения БКЗ, алкалоидов и их смеси (1 : 1) БКЗ и алкалоиды растворяли в хлороформе как описано выше и снимали спектр поглощения напротив хлороформа в кварцевых кюветах на спектрофотометре LAMBDA 25 (“PerkinElmer”, США) в области 240–700 нм.

Для построения калибровочных кривых использовали 0.1% раствор атропина сульфата, папаверина гидрохлорида, никотина. К 0.5 мл фосфатно-цитратного буфера, pH 4.7 добавляли необходимый объем алкалоида (0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 мкл) и 0.5 мл 0.1 мМ водного раствора БКЗ. Для формирования ионной пары БКЗ–алкалоид реакцию смесь (буфер, алкалоид, БКЗ) выдерживали 3–5 мин при комнатной температуре и затем экстрагировали дважды

хлороформом. Для этого реакционную смесь интенсивно перемешивали на вортексе (“Elmi”, Латвия) с 0.5 мл хлороформа, затем дожидались расслоения фаз, пипеткой отбирали нижнюю фазу, а к водной фазе добавляли 0.5 мл хлороформа и повторяли процедуру. Конечный объем хлороформного образца доводили чистым хлороформом до 1 мл. Для получения холостого раствора к буферу добавляли БКЗ и проводили экстракцию хлороформом как описано выше. Образцы сканировали на спектрофотометре LAMBDA 25 (“PerkinElmer”, США) в диапазоне от 350 до 700 нм. По значениям оптической плотности при максимуме поглощения ионной пары (417 нм – для атропина, 418 нм – для папаверина, 414 нм – для никотина) были построены калибровочные кривые.

В экспериментах по подбору pH буферного раствора в качестве тестового алкалоида был использован папаверина гидрохлорид в концентрации 5 мкг и буфер с pH равным 3.0, либо 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 5.4. В экспериментах по подбору оптимального времени реакционную смесь, содержащую 4 мкг алкалоида (атропина сульфата, папаверина гидрохлорида, либо никотина), выдерживали в течение 0, 5, 10, 30 мин при комнатной температуре до экстракции хлороформом. В экспериментах по изучению стабильности ионной пары спектры поглощения снимали через 10, 20, 60 мин, 1 сут.

Подготовка образцов препарата с известной концентрацией алкалоидов

Таблетку препарата “Раунатин” взвешивали и измельчали в ступке. К навеске из полученного порошка, соответствующей 1 мг алкалоидов Раувольфии змеиной, добавляли 1 мл подкисленного 70% этанола (0.5% уксусная кислота, об/об). Экстракцию алкалоидов проводили при 80°C 30 мин, затем центрифугировали (10 мин, 10000 g на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, США)), полученный супернатант использовали в качестве стокового раствора (1 мг/мл) для анализа.

Препарат “Сангвинаритрин”, который, согласно инструкции по применению препарата, содержал сумму гидрохлоридов сангвинина и хелеритрина (0.2% раствор в этаноле), смешивали с водой MilliQ (1 : 1), использовали в качестве стокового раствора (1 мг/мл).

Экстракция алкалоидов из образцов Руты душистой

Побеги регенерантов лиофильно высушивали на сублимационной сушилке Alpha 1-4 LD-2 (“Martin Christ”, Германия). Высушенные побеги растений-регенерантов и содержимое аптечного препарата “Рута душистая трава” размалывали на шаровой мельнице MM400 (“Retsch”, Германия) при частоте 25 Гц в течение 3 мин.

Для экстракции алкалоидов 20 мг образца заливали 0.5 мл подкисленного 70% этанола в 0.5% уксусной кислоте, обрабатывали ультразвуком (УЗ) (5 мин, 30 кГц, 20°C), а затем инкубировали в термостате в течение 1 ч при 80°C (“Labtex”, Россия). Гомогенат центрифугировали (10 мин, 10000 g), супернатант отбирали, к осадку добавляли 0.2 мл 70% подкисленного этанола, обрабатывали УЗ (2–3 мин) и инкубировали при 80°C в течение 0.5 ч. Гомогенат центрифугировали (10 мин, 10000 g), супернатанты объединяли. Аликвоты по 0.2 мл спиртового экстракта высушивали при 35°C, 20 ГПа на вакуумном концентраторе (“Eppendorf Concentrator plus/Vacufuge TM”, USA), использовали для последующего извлечения из них алкалоидов.

Экстракция алкалоидов из этанольного экстракта для спектрофотометрического определения алкалоидов

К высушенному экстракту добавляли 50 мкл 2N HCl, обрабатывали УЗ (5 мин, 30 кГц, 20°C), центрифугировали (5 мин, 10000 g), супернатант отбирали, к осадку добавляли 50 мкл 2N HCl и процедуру повторяли. Объединенный супернатант, содержащий алкалоиды в виде водорастворимых солей, отмывали от липофильных веществ 1 мл хлороформа. Верхнюю водную фазу отбирали пипеткой и нейтрализовали равным объемом 2N NaOH. Объем нейтрализованного раствора доводили водой до 0.5 мл и использовали для спектрофотометрического определения алкалоидов как описано выше.

Подготовка образцов для ТСХ и проведение ТСХ-анализа

Аликвоту (0.2 мл) нейтрализованного раствора лиофильно высушивали. К полученному осадку добавляли 100 мкл метанола и центрифугировали (1 мин, 10000 g). Для ТСХ алкалоидов использовали пластины ПТСХ-АФ А-УФ с индикатором УФ-254 (“Sorbfil”, Россия). 20 мкл супернатанта наносили на стартовую линию в виде полос шириной 4–5 мм. Разделение веществ проводили в смеси этилацетат–уксусная кислота–муравьиная кислота–вода (90:10:10:24). Смесь после смешивания расслаивали центрифугированием (1 мин, 1000 g), использовали верхнюю фазу. ТСХ-пластину рассматривали на трансиллюминаторе ТСП-20 МС (“Vilbert Lourmat”, Франция) при 254 и 312 нм. Для проявления пятен алкалоидов применяли реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье [16].

Выделение и очистка алкалоидов из спиртового экстракта для ВЭЖХ анализа

Очистку фракции алкалоидов проводили по модифицированной методике [17]. К высушенному экстракту добавляли 0.25 мл 2N HCl

и оставляли при 24°C на 1 час. К этому раствору добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и расслаивали центрифугированием (1 мин, 1000 g). Нижнюю (хлороформную) фазу, содержащую кумарины, отбрасывали. Верхнюю (водную) фазу, содержащую соли алкалоидов, отбирали и подщелачивали 10% раствором NH₄OH до pH 9.5, оставляли на 30 мин при 24°C, затем добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и расслаивали центрифугированием (1 мин, 1000 g). Нижнюю (хлороформную) фазу, содержащую основания алкалоидов, отбирали и высушивали досуха в струе воздуха при 50°C. Полученный осадок смеси алкалоидов растворяли в 100 мкл 80% этанола, подкисленного с помощью HCl (до 2%, об/об), и использовали для дальнейшего ВЭЖХ анализа.

ВЭЖХ алкалоидов проводили на хроматографической системе высокого давления BioLogic DuoFlow™ (“BioRad”, США), использовали колонку “Symmetry® C18”, размеры колонки – 3.9 × 150 мм, наполнитель с размером частиц 5 мкм и размером пор 100Å (“Waters”, США). Детекцию пиков алкалоидов осуществляли посредством детектора BioLogic QuadTec UV/Vis (“BioRad”, США) при длине волны 280 нм. Для разделения использовали следующие растворы: раствор А – деионизированная вода MilliQ, раствор Б – 60% ацетонитрил. Скорость потока – 0.8 мл/мин. Градиент раствора Б был применен по следующей схеме: 0–1 мин – 0%; 1–11 мин – 0–10%; 11–36 мин – 10–100%; 36–41 мин – 100%; 41–42 мин – 100–0%; 42–45 мин – 0%. В колонку вносили по 50 мкл полученной смеси алкалоидов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы “SigmaPlot”. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. Значимость отличий определяли, используя критерий Тьюки для множественных сравнений (ANOVA) при уровне $P \leq 0.05$ и Т-критерий Стьюдента для сравнения двух вариантов между собой при уровне $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Спектры поглощения БКЗ, алкалоидов и ионной пары БКЗ–алкалоид

Для получения спектров поглощения чистых веществ в диапазоне 200–700 нм алкалоиды и БКЗ были растворены в хлороформе в конечной концентрации 10⁻⁴ М как описано в разделе “Материалы и Методы”; в качестве холостого раствора был использован хлороформ. Было выявлено, что БКЗ (рис. 1а) и алкалоиды (рис. 1б) поглощают свет в УФ области. Пики поглощения в области 200–380 нм были: для БКЗ – 244, 284, 294 нм, для атропина – 209 нм, для папаве-

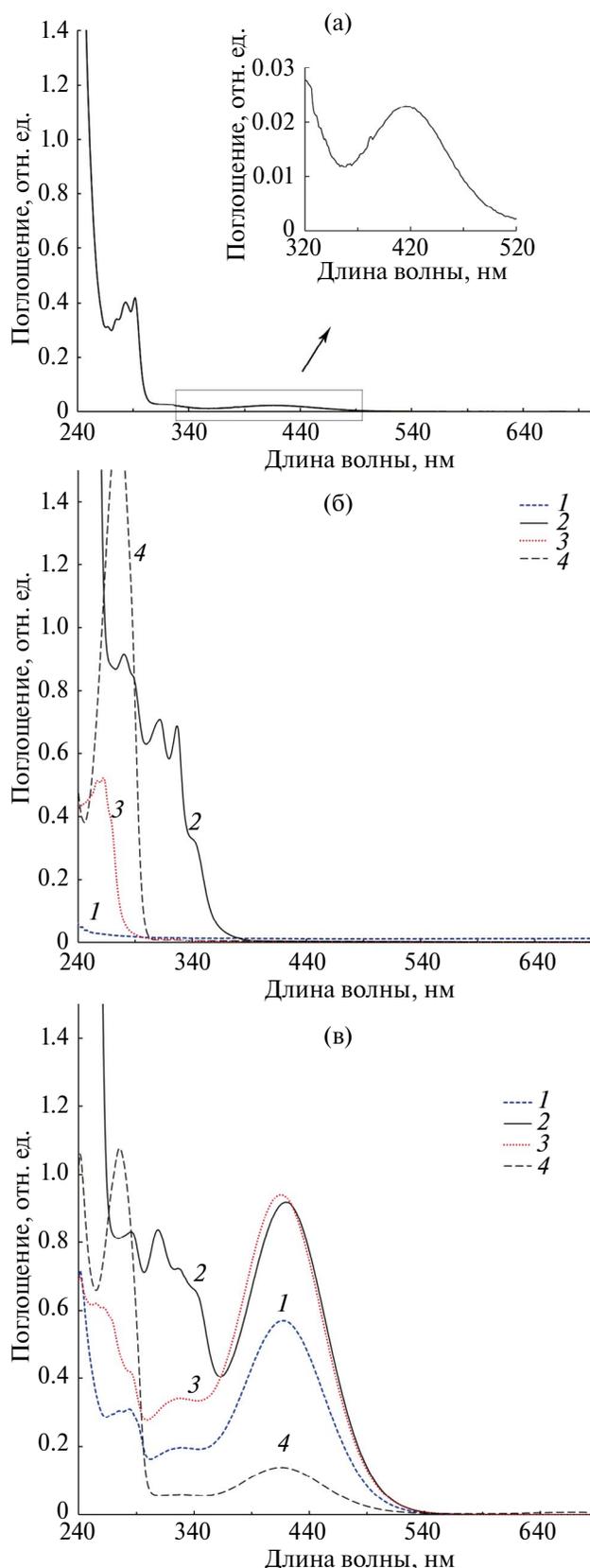


Рис. 1. Спектры поглощения растворенных в хлороформе: бромкрезолового зеленого (БКЗ, 10^{-4} М) (а), алкалоидов (10^{-4} М) (б), ионной пары БКЗ–алкалоид ($5 \cdot 10^{-3}$ М) (в). Алкалоиды: атропина сульфат (1), папаверина гидрохлорид (2), никотин (3), кофеин (4). Ионные пары: БКЗ–атропина сульфат (1), БКЗ–папаверина гидрохлорид (2), БКЗ–никотин (3), БКЗ–кофеин (4).

рина гидрохлорида – 254 нм, для никотина – 264 нм, для кофеина – 260 нм. В видимой области в спектре БКЗ обнаружено слабое поглощение в области 420 нм с оптической плотностью менее 0.02 ед. (рис. 1а, верхняя вставка), в спектре алкалоидов в этой области – плато (рис. 1б). Однако при смешивании БКЗ с образцами алкалоидов в соотношении 1 : 1 появлялся пик с широким плато в области 410–420 нм, что свидетельствует о формировании связи между БКЗ и алкалоидом (рис. 1в).

Влияние рН на формирование ионной пары БКЗ–алкалоид

Для формирования ионной пары БКЗ–алкалоид большое значение имеет рН среды, в которой смешивается два реагента. БКЗ в водном растворе находится в двух состояниях – моноанионной и дианионной формах. В кислой среде преобладает моноанионная форма, раствор индикатора в этом состоянии имеет желтый цвет, а в нейтральной и щелочной среде происходит депротонизация и образуется дианионная форма, при которой БКЗ имеет синий цвет. Соответственно, при одной аналитической концентрации индикатора спектры поглощения БКЗ будут иметь преобладающий пик либо в фиолетовой (410 нм), либо в красной (620 нм) частях спектра в зависимости от рН среды. Известно, что рКа для раствора БКЗ равна 4.8 [18], а рН 5.4 является точкой перехода в доминирующую дианионную форму [1].

Для того чтобы подобрать оптимальное значение рН для формирования ионной пары, были протестированы фосфатно-цитратные буферные растворы с рН 3.0, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 и 5.4. В первую очередь были сняты спектры поглощения холостых растворов, в качестве зануляющего раствора был использован хлороформ (рис. 2а). Было выявлено, что при использовании буфера с рН 4.5 и рН 4.6 оптическая плотность при 417 нм была наивысшей и составляла 0.12 опт. ед. Можно предположить, что при рН 4.5, 4.6 в хлороформ переходит наибольшее количество анионной формы БКЗ, чем при рН 3.0, 4.7, 4.8, 5.4. Далее были сняты спектры поглощения ионных пар БКЗ–папаверин, сформированных при разных рН, каждый с использованием своего холостого раствора. Как следует из рис. 2б, рН буфера влияло на оптическую плотность раствора с ионной парой. Следует отметить, что при использовании буферов с рН 4.5, 4.6 и 4.7 и значения оптической плотности при 417 нм были самыми высокими среди всех снятых спектров и составляли 0.25, 0.255, 0.264 опт. ед., соответственно (рис. 2б). При рН 5.4 оптическая плотность при 417 нм была наименьшей и составляла 0.13 опт. ед. В дальнейших исследованиях для приготовления реакционной смеси был выбран

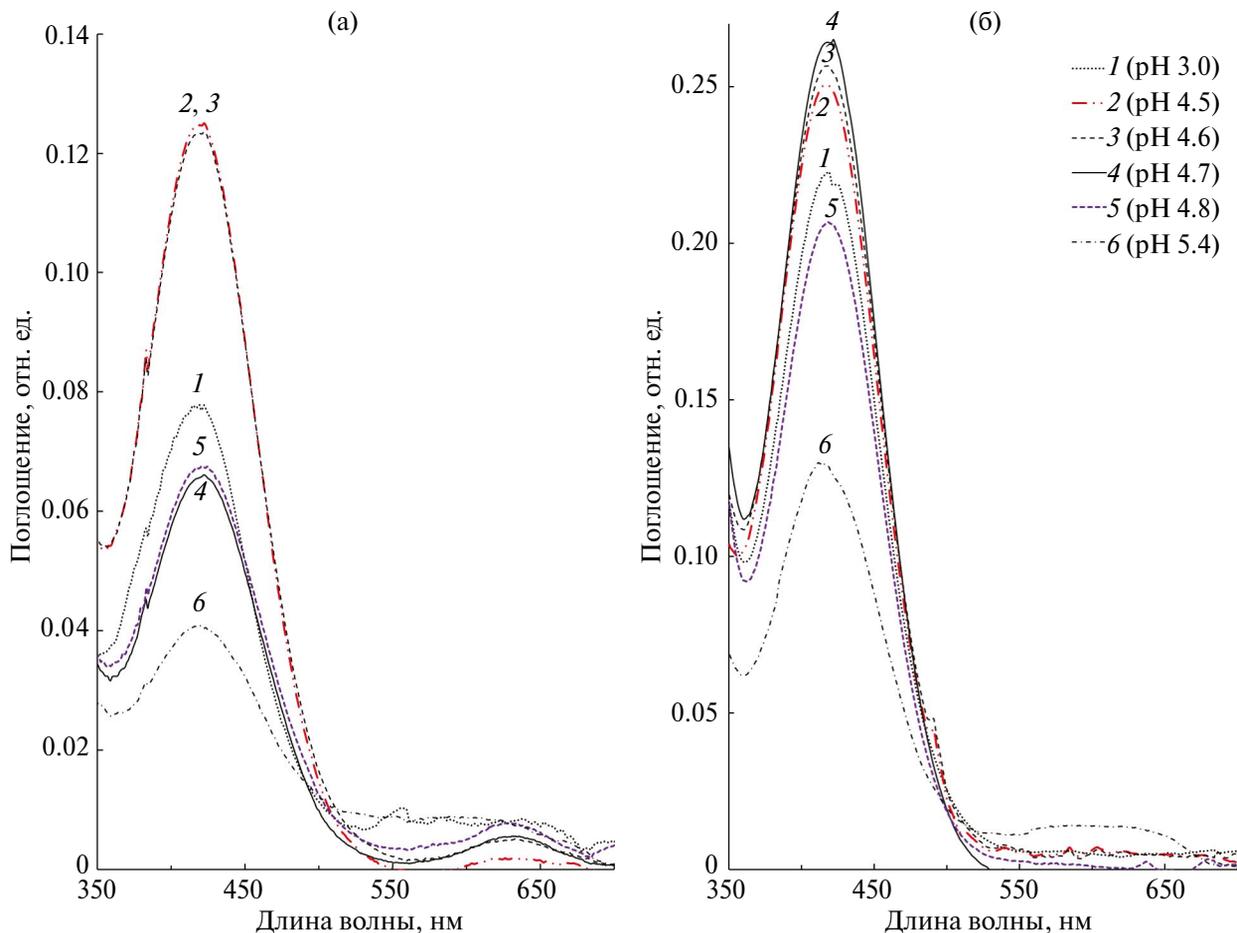


Рис. 2. Спектры поглощения холостых растворов (а), ионной пары БКЗ–папаверин гидрохлорида (б) при разном рН буфера в реакционной смеси: рН 3.0 (1), рН 4.5 (2), рН 4.6 (3), рН 4.7 (4), рН 4.8 (5), рН 5.4 (6). В качестве зануляющих растворов были взяты: хлороформ для холостых растворов, холостые растворы – для ионных пар.

буфер с рН 4.7, поскольку при его использовании поглощение ионной пары было максимальным (0.26 опт. ед.), а поглощение холостого раствора приемлемо невысоким (0.06 опт. ед.).

Подбор оптимального времени для спектрофотометрических измерений ионной пары БКЗ–алкалоид

На разброс получаемых значений может оказывать время, необходимое для формирования ионной пары, а также время, в течение которого ионная пара сохраняется в органическом растворителе в неизменной форме. Согласно литературным данным, реакционную смесь до экстракции хлороформом выдерживают от 1–5 мин [19, 20] до 1 ч [4]. Нами показано, что максимальное развитие окраски достигается практически сразу и в течение 5–30 мин выдерживания реакционной смеси до экстракции ионной пары хлороформом, достоверной разницы между образцами выявлено не было (Дополнительные материалы, табл. 1).

В литературе отмечается разное время стабильности ионной пары от 2 ч [5] до 2 сут [19],

что может зависеть от структуры алкалоида. Показано, что при выдерживании алкалоида в органическом растворителе происходит изменение спектров поглощения алкалоидов, которые имеют в гетероцикле третичный амин (но не вторичный амин), либо первичный амин в боковой цепи [21], что, по данным авторов, связано с медленным химическим взаимодействием хлороформа с третичным амином [21]. Наши исследования показали, что спектр поглощения (данные не представлены) и оптическая плотность (рис. 3а) ионных пар не изменялись в течение часа, однако через сутки происходил сдвиг пика поглощения ионной пары в более коротковолновую область на 17 нм (рис. 3б).

Для дальнейших исследований были выбраны следующие оптимальные условия:

1. рН реакционной смеси – 4.7;
2. время выдерживания реакционной смеси до экстракции хлороформом – 5 мин;
3. измерение спектров поглощения – в течение часа после экстракции ионной пары хлороформом.

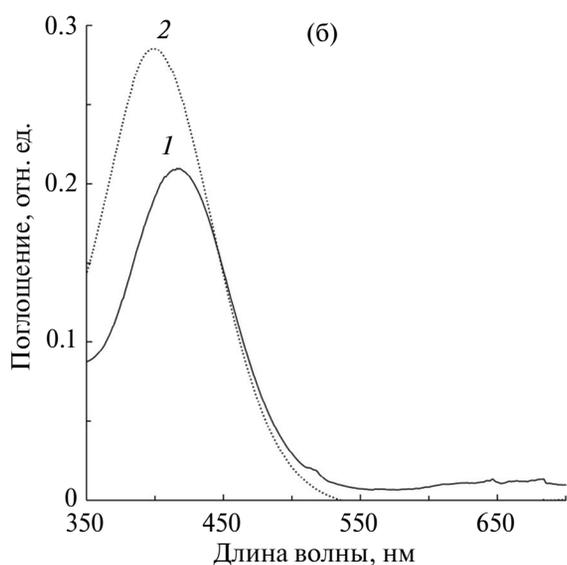
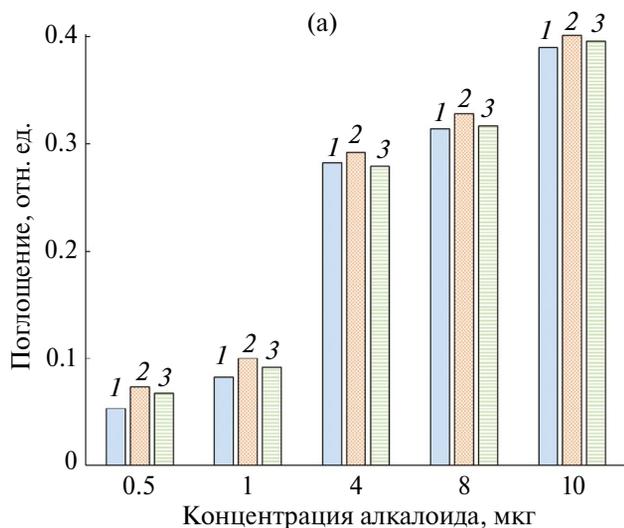


Рис. 3. Значения оптической плотности ионной пары БКЗ–алкалоид при 418 нм через 10 (1), 20 (2), 60 мин (3) после экстракции из реакционной смеси хлороформом (а) и спектры поглощения ионной пары БКЗ–алкалоид (б, БКЗ–раунатин, 4 мкг), измеренные через 5 мин (сплошная линия, 1) и через 1 сут (пунктирная линия, 2) после экстракции из реакционной смеси хлороформом.

Сравнение калибровочных кривых для разных алкалоидов

Для построения калибровочных кривых были использованы алкалоиды разных классов: тропановый алкалоид атропин, изохинолиновый алкалоид папаверин, пиридиновый алкалоид никотин. Спектры поглощения ионных пар были сняты для различных концентраций алкалоида от 0.5 до 100 мкг/мл хлороформа (Дополнительные материалы, рис. S1). Для диапазона концентраций алкалоида от 2 до 10 мкг/мл, где соблюдался закон Бугера-Ламберта-Бера, были построены калибровочные кривые по зависимости поглощения при λ_{max} от концентрации алкалоида: при 417, 418, 414 нм для атропина сульфата (рис. 4а),

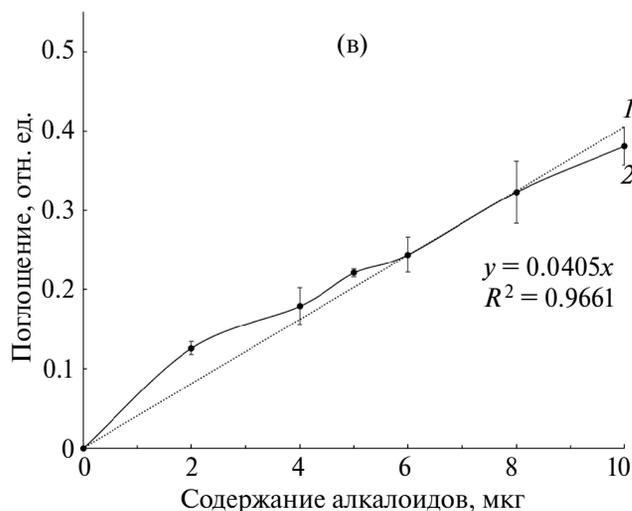
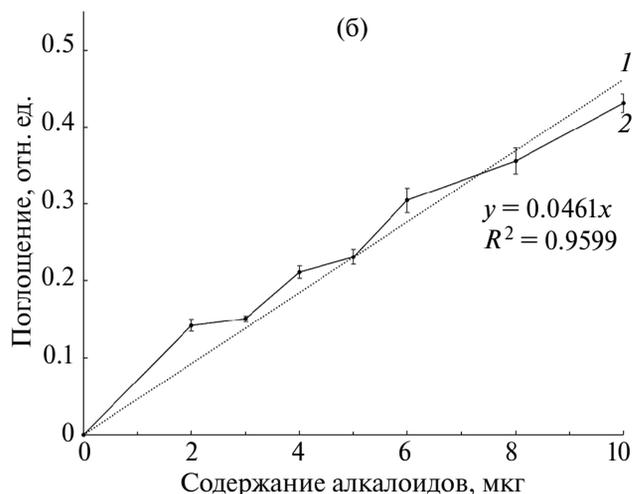
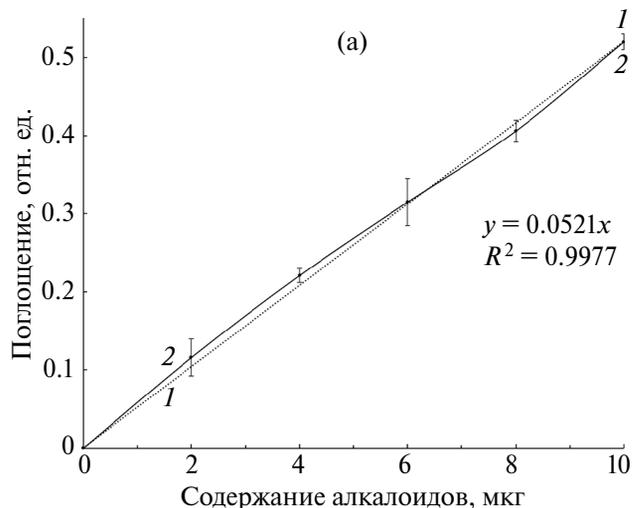


Рис. 4. Калибровочные кривые для определения содержания алкалоидов в растительных образцах: по атропину (а), папаверину (б), никотину (в). Пунктирными линиями отмечены линии тренда (1) для каждой калибровочной кривой (2).

папаверина гидрохлорида (рис. 4б) и никотина (рис. 4в) соответственно. Коэффициент корреляции и уравнение регрессии представлены на рис. 4 и в табл. 2 (Дополнительные материалы).

Верификация метода

Для верификации спектрофотометрического метода определения содержания алкалоидов были использованы аптечные препарат “Раунатин”, в таблетках которого по данным производителя содержится по 2 мг алкалоидов индольного ряда из Раувольфии змеиной, и препарат “Сангвиритрин”, представлявший собой этанольный раствор солей алкалоидов изохинолинового ряда, сангвинарина и хелеритина. Для измерений были взяты аликвоты образцов, соответствующие 4 мкг алкалоидов, для расчетов была использована калибровочная кривая для папаверина, алкалоида изохинолинового ряда. Спектрофотометрическое определение алкалоидов показало, что в аликвоте препарата “Раунатин” содержится в среднем 4.053 ± 0.270 мкг алкалоидов, а в аликвоте препарата “Сангвиритрин” – 4.199 ± 0.304 мкг алкалоидов, что составило соответственно 101.3% и 105% от заявленного производителем содержания алкалоидов.

Определение содержания алкалоидов в образцах Руты душистой

Спектрофотометрическое определение содержания алкалоидов в образцах Руты душистой выявило, что в аптечном препарате содержание алкалоидов в 1.62 раз выше, чем в растениях-регенерантах, полученных из культуры клеток *in vitro*. Содержание алкалоидов в аптечном препарате и в растениях-регенерантах,

рассчитанное по калибровочной кривой для папаверина гидрохлорида, составило 17.12 ± 0.52 и 10.55 ± 0.33 мг/г сухого веса соответственно. Разница между образцами была достоверной ($P < 0.001$).

ТСХ этанольного экстракта образцов Руты душистой

ТСХ анализ экстракта выявил наличие трех разных пятен, окрашиваемых реактивом Драгендорфа (рис. 5в, 1а, 1б, 2с). Алкалоиды, обнаруженные в аптечном препарате “Руты душистой трава”, не флуоресцируют, а, наоборот, гасят свечение флуорофора при 254 нм, на светящемся зеленом фоне флуорофора они выглядят как темные пятна (рис. 5а, 1а, 1б, отмечены стрелками). При рассматривании пластины при 312 нм эти пятна имеют темно-фиолетовую окраску (рис. 5б, 1а, 1б, отмечены стрелками). Алкалоид из образца растений-регенерантов представляет собой пятно темно-синего цвета при обследовании пластины при 254 нм (рис. 5а, 2с), при 312 нм это пятно флуоресцирует ярко-голубым цветом (рис. 5б, 2с). Следует отметить, что ТСХ-анализ имеет слабую разрешающую способность и несколько разных соединений могут мигрировать с фронтом растворителя с близкой скоростью и на ТСХ-пластине будут представлены в виде единого пятна. Таким образом, ТСХ-анализ подтвердил наличие алкалоидов в образцах Руты душистой и было определено, что образцы могут

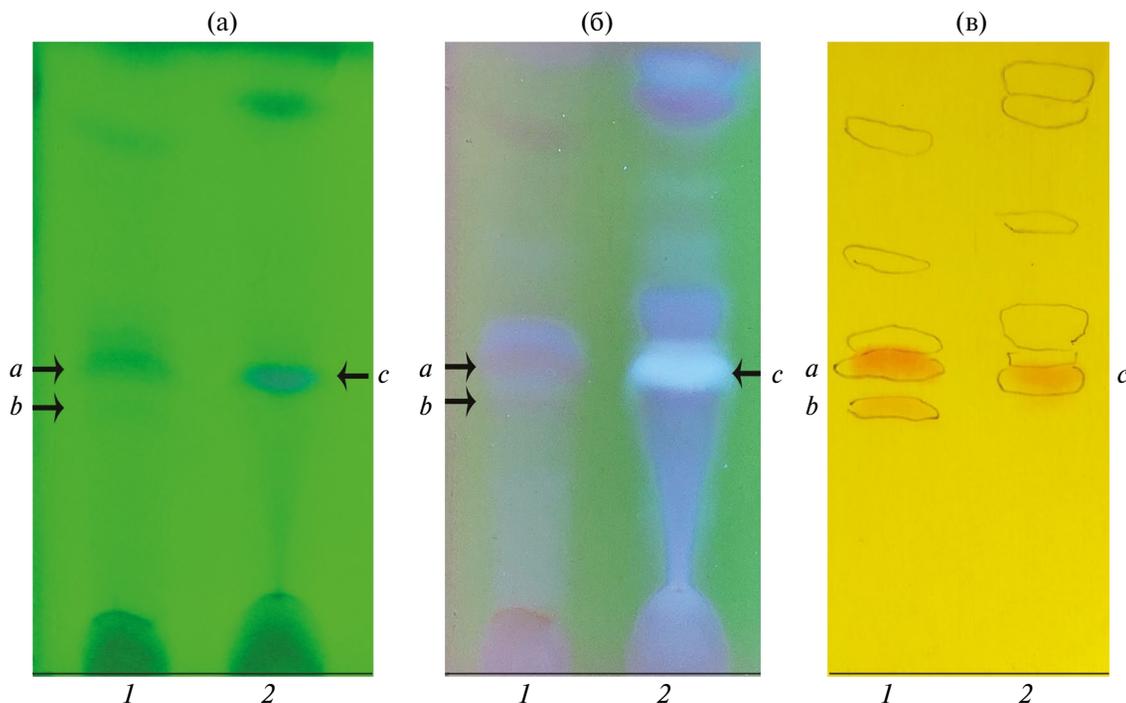


Рис. 5. ТСХ экстрактов аптечного препарата “Руты душистой трава” (1) и растений-регенерантов Руты душистой (2): а – флуоресценция при 254 нм, б – флуоресценция при 312 нм, в – окрашивание реактивом Драгендорфа. Стрелками и разными буквами латинского алфавита отмечены алкалоиды, прореагировавшие с реактивом Драгендорфа.

содержать разные типы алкалоидов, но точное количество соединений в нейтрализованном растворе фракции алкалоидов из спиртового экстракта определить не удалось.

ВЭЖХ очищенных алкалоидов

ВЭЖХ анализ очищенной фракции алкалоидов аптечного препарата и растений-регенерантов выявил наличие 16 пиков, из которых 6 пиков присутствовали в спектрах обоих образцов, но имели разную интенсивность (рис. 6). Пик 5 был специфичен для образца аптечного препарата, а пики 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15 и 16 присутствовали только в образце растений-регенерантов. В ВЭЖХ-спектре образца аптечного препарата наибольшую интенсивность имел пик 1, в спектре растений-регенерантов по интенсивности пики были сравнимыми между собой, наибольшую интенсивность имели пики 6 и 13.

ОБСУЖДЕНИЕ

подавляющее большинство истинных алкалоидов, а также псевдоалкалоидов содержат атом азота внутри гетероцикла, в основном в виде третичного или вторичного амина, реже — четвертичного, тогда как протоалкалоиды содержат первичный амин в боковой алифатической цепи. В литературе отмечается, что с БКЗ не реагируют протоалкалоиды [22]. Нами было выявлено, что спектр поглощения колхицина не изменялся при смешивании с БКЗ (1 : 1), происходил только “эффект разведения” — интенсивность поглощения всего спектра снижалась (Дополнительные материалы, рис. S2).

БКЗ с алкалоидами образует ионную пару [23], поэтому большое значение для реакции имеет способность алкалоидов проявлять основ-

ные свойства. Окружение неподеленной пары электронов азота, например, при наличии амидных групп, может ослаблять основные свойства алкалоида, приводя к нейтральным или амфотерным свойствам. Слабая реакция кофеина с БКЗ (рис. 1в), наиболее вероятно, связана со слабыми основными свойствами данного алкалоида. Концентрационную кривую для кофеина построить не удалось, поскольку не был найден диапазон линейной зависимости концентрации кофеина от оптической плотности, при которой прямая проходила бы через начало координат (данные не представлены).

Пик поглощения ионной пары БКЗ–алкалоид лежит в области 412–420 нм (рис. 1в): для атропина сульфата — 417 нм, для папаверина гидрохлорида — 418 нм, для никотина — 414 нм. Эти значения близки к данным, представленным в литературе: 415 нм — для аконитина [4] и берберина [5], 420 нм — для атропина [6]. Следует отметить, что у всех изученных ионных пар достаточно широкое плато с близкими значениями оптической плотности, поэтому пик поглощения сглаживается.

Согласно литературным данным, существует зависимость между молярным соотношением алкалоида к БКЗ и спектром поглощения ионной пары [1, 23]. Это соотношение должно быть близким к 1 : 1. По данным Gaínza, при избытке индикатора или при эквимольном соотношении индикатора и алкалоида наблюдается пик поглощения при 410 нм и соблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации алкалоида [23]. Тогда как при избытке алкалоида наблюдается появление дополнительного пика при 562 нм. Мы не обнаружили появление значимого пика в красной области при избытке алкалоидов (данные не представлены).

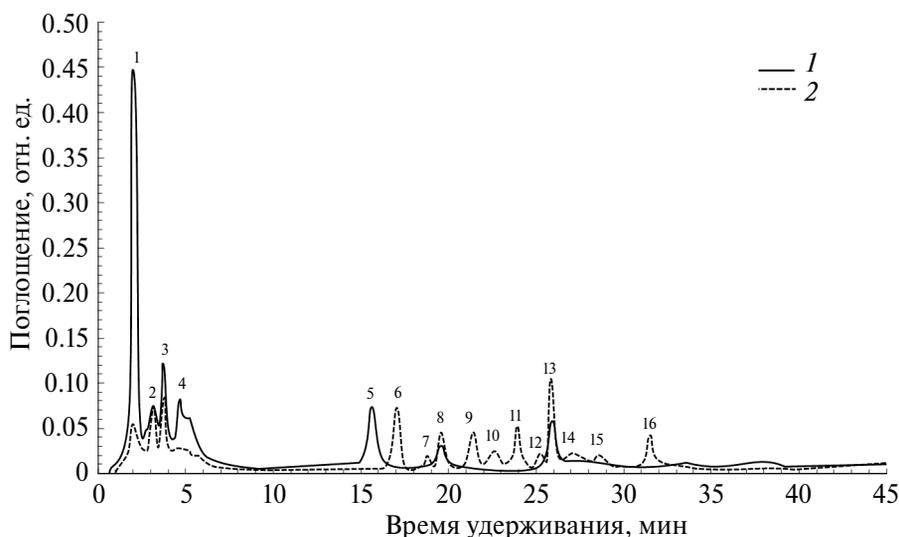


Рис. 6. ВЭЖХ-спектры очищенных фракций алкалоидов аптечного препарата “Рута душистая трава” (1, сплошная линия) и растений-регенерантов Руты душистой (2, пунктирная линия).

Наиболее важным фактором является влияние рН на спектр поглощения ионной пары БКЗ–алкалоид и ее экстрагируемость хлороформом. В методиках, представленных в литературе, использовался буфер с разной кислотностью: от сильно кислых с рН 3.0 [19] и рН 4.0 [4], до слабо кислых с рН 4.7 [5,6] и рН 5.4 [1]. Sakai с соавт. для формирования ионной пары БКЗ–алкалоид используют слабо щелочную рН 8.5 и измерения проводят в красной области спектра [24]. На примере никотина мы оценили приемлемость такого подхода для данного метода (Дополнительные материалы, рис. S3). Действительно, появляется пик в красной области (при 620 нм), однако пик моноанионной формы (при 414 нм) остается, а наличие двух пиков делает расчеты концентрации вещества более сложными.

Thomis и Kotionis отмечают, что чувствительность метода снижается, если реакция образования ионной пары проводится при рН, превышающих значения, характеризующие “щелочную” реакцию БКЗ [1]. С другой стороны, при значениях рН ниже оптимального БКЗ частично переходит в органический растворитель, поэтому необходимо подбирать оптимальный рН буферного раствора [1]. Нами было показано, что при рН 4.5 и 4.6 БКЗ сильнее экстрагируется хлороформом, чем при рН 4.7 (рис. 2а), поэтому несмотря на то, что буфер с рН 4.5, 4.6 и 4.7 дает одинаковые значения оптической плотности для ионных пар БКЗ–алкалоид (рис. 2б), значения рН 4.5 и 4.6 не являются оптимальными. Для уменьшения погрешностей предпочтительнее использовать тот буфер, в котором БКЗ меньше экстрагируется в растворитель и создает меньший фон. По этой же причине лучше использовать меньшую концентрацию БКЗ (0.1 мМ), поскольку при большей концентрации (0.5 мМ) БКЗ переходит в хлороформ в большем количестве (Дополнительные материалы, рис. S4), при этом по сравнению с 0.1 мМ БКЗ сложно выделить диапазон линейной зависимости в калибровочной кривой, где бы соблюдался закон Бугера-Ламберта-Бера (Дополнительные материалы, рис. S1б, 2).

Li с соавт. вместо холостого раствора используют чистый хлороформ [3], однако, как следует из данных, представленных нами на рис. 2, даже при смешивании БКЗ с буфером рН 5.4 в этой части спектра наблюдается небольшой пик поглощения, поэтому при измерении образцов необходимо проводить обнуление по холостому раствору, приготовленному с БКЗ.

Таким образом, рН является важным фактором для экстракции ионной пары БКЗ–алкалоид органическим растворителем из водного раствора.

Калибровочные кривые для атропина сульфата, папаверина гидрохлорида и никотина имеют узкий диапазон концентраций (от 2 до

10 мкг/мл), в котором соблюдается закон Бугера-Ламберта-Бера (рис. 4, Дополнительные материалы, рис. S1, Дополнительные материалы, табл. 2). Тем не менее, эти значения являются приемлемыми, поскольку для растений, содержащих алкалоиды в незначительных количествах, можно детектировать их без предварительной очистки и концентрирования, а в растениях, содержащих алкалоиды в высоких концентрациях, следует подобрать необходимое разведение. Сангвинарин, как и папаверин, является алкалоидом изохинолинового ряда, а индольные алкалоиды препарата “Раунатин” более близки по структуре к папаверину, чем к атропину и никотину. На препаратах “Раунатин” и “Сангвинаритин” нами показано, что методика является хорошо воспроизводимой. Наиболее близкие значения по содержанию алкалоидов к значениям, заявленным производителем, были при расчете содержания по калибровочной кривой, построенной для папаверина. Представленный в статье метод не может претендовать на универсальность, поскольку имеет ограничения. Например, он не подходит для определения содержания колхицина (и других алкалоидов с азотом в боковой цепи), а также кофеина и, вероятно, для других алкалоидов со слабыми основными свойствами. Однако для тропановых, изохинолиновых, индольных, пиридиновых алкалоидов и с высокой долей вероятности для большинства других истинных алкалоидов данный метод работает. Следует также помнить, что каждый этап процесса подготовки образца вносит свои погрешности и стандартное отклонение для выборки растительных образцов будет большим, чем для выборки образцов чистых алкалоидов, не нуждающихся в процедуре очистки. Тем не менее, на основании данных, представленных в данной статье, метод спектрофотометрического определения алкалоидов с БКЗ может использоваться как экспресс-метод определения содержания алкалоидов и как альтернатива трудоемким методам определения содержания алкалоидов.

В одном виде растений обычно содержатся родственные алкалоиды одной группы, однако в некоторых видах, например, в Руте душистой, могут встречаться алкалоиды разных классов. Кроме того, содержание и состав алкалоидов изменяется под воздействием внешних условий и зависит от возраста растений или растительной культуры [7, 25, 26]. Szewczyk с соавт. отмечают, что побеги Руты душистой, культивируемой *in vitro*, сильно отличаются от материнских растений, их метаболизм направлен в сторону синтеза фурухинолиновых алкалоидов, содержание которых в культуре *in vitro* достигает 0.8–1.6 мг/г сухого веса [7]. К фурухинолиновым алкалоидам, обнаруженным в Руте душистой, относят диктамнин, скимианин, γ -фагарин, кокусаги-

нин [10, 16]. Показано также, что суспензионная культура [25], каллусы и культура растений-регенерантов руты *in vitro* [26] содержат акридоновые алкалоиды. Обнаружено порядка 20 различных акридоновых алкалоидов, из которых наиболее распространенным является рутакридон [13, 27]. Содержание рутакридона в отселектированной высокопроизводительной каллусной культуре Руты душистой достигало 1.8% от сухого веса, что по данным авторов в 10 раз больше, чем содержание рутакридона в 3-недельных растениях, выращенных в условиях *in vivo* [28]. В работе Ramawat с соавт. показано, что общее содержание алкалоидов в каллусной линии, обильно образующей побеги, составляло 9.44 мг/г сухого веса [29]. Для растений-регенерантов мы получили близкое значение – 10.13 мг/г сухого веса. Мы показали, что в аптечном препарате общее содержание алкалоидов выше, чем в растениях-регенерантах, однако состав алкалоидов в них отличался. На ТСХ-пластине в образце аптечного препарата были выявлены два нефлуоресцирующих пятна, которые должны содержать алкалоиды, поскольку реагируют с реактивом Драгендорфа, но, скорее всего, не относятся ни к акридоновым алкалоидам, имеющим желтую флуоресценцию [26], ни к фуорохинолиновым алкалоидам, флуоресцирующим синим цветом [16]. Возможно, это хинолиновый алкалоид, например, гравеолин, который содержится преимущественно в надземных частях растения. В образцах растений-регенерантов обнаруживается соединение с голубой флуоресценцией, оно реагирует с реактивом Драгендорфа (рис. 5) и, возможно, относится к фуорохинолиновым алкалоидам. Следует отметить, что реактив Драгендорфа с разными алкалоидами реагирует в разной степени [30]. Содержание алкалоидов на ТСХ пластине может быть достаточным для выявления соединений в виде флуоресцирующих либо темных пятен, но при этом может быть недостаточным для получения положительной реакции с реактивом Драгендорфа.

ВЭЖХ анализ очищенных фракций алкалоидов выявил наличие 16 соединений. Время удерживания четырех пиков, выходящих первыми, составляет всего 2–5 мин, что свидетельствует об их гидрофильности, возможно это гликозилированные формы алкалоидов. Следует отметить, что их содержание выше в аптечном препарате. Кузовкиной с соавт. [31] показано, что в каллусной и суспензионной культуре тканей Руты душистой, также как и в растениях, может содержаться гликозид гравакридонииола. Основные отличия между образцами по составу отмечены среди гидрофобных соединений, соответствующим пикам 5–16, спектр соединений у растений-регенерантов богаче (рис. 6).

Выявленные по результатам ТСХ и ВЭЖХ качественные различия между экстрактами аптечного препарата и регенерантами, полученными *in vitro*, вероятно, опосредованы изменением метаболизма алкалоидов в растениях *in vitro*, что требует дополнительных исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственных заданий, выполняемых КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (№ госрегистрации 122011800137-0).

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. *Thomis G.N., Kotionis A.Z.* Les indicateurs acides comme réactifs sensibles des alcaloïdes // *Anal. Chim. Acta.* 1957. V. 16. P. 201.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)89913-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)89913-4)
2. *Maghssoudi R.H., Fawzi A.B.* Direct spectrophotometric determination of thebaine in Arya II population capsules of *Papaver bracteatum* Lindl // *J. Pharm. Sci. (Philadelphia, PA, U. S.)*. 1978. V. 67. P. 32.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600670109>
3. *Li L., Long W., Wan X., Ding Q., Zhang F., Wan D.* Studies on quantitative determination of total alkaloids and berberine in five origins of crude medicine “Sankezhen” // *J. Chromatogr. Sci.* 2015. V. 53. P. 307.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu060>
4. *Liu Y., Liu C.* Determination of total alkaloids in different parts of *Actinidia arguta* by spectrophotography // *Proc. International Conference on Materials, Environmental and Biological Engineering (MEBE 2015)*. Guilin, 2015.
<https://doi.org/10.2991/mebe-15.2015.31>
5. *Patel R.K., Patel J.B., Trivedi P.D.* Spectrophotometric method for the estimation of total alkaloids in the *Tinospora cordifolia* M. and its herbal formulations // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015. V. 7. P. 249.
6. *Shamsa F., Monsef H.R., Ghamooshi R., Verdian R.M.R.* Spectrophotometric determination of total alkaloids in *Peganum harmala* L. using bromocresol green // *Res. J. Phytochem.* 2007. V. 1. P. 79.
7. *Szewczyk A., Marino A., Molinari J., Ekiert H., Micali N.* Phytochemical characterization, and antioxidant and antimicrobial properties of agitated cultures of three Rue species: *Ruta chalepensis*, *Ruta corsica*, and *Ruta graveolens* // *Antioxidants*. 2022. V. 11. P. 592.
<https://doi.org/10.3390/antiox11030592>
8. *Kamal L.Z.M., Adam M.A.A., Shahpuhin S.N. Mohd., Shuib A.N., Sandai R., Hassan N.M., Tabana Y., Basri D.F., Than L.T.L., Sandai D.* Identification of alkaloid compounds arborinine and graveoline from *Ruta*

- angustifolia* (L.) Pers for their antifungal potential against isocitrate lyase (ICL1) gene of *Candida albicans* // Mycopathologia. 2021. V. 186. P. 221. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00523-z>
9. Wolters B., Eilert U. Antimicrobial substances in callus cultures of *Ruta graveolens* // Planta Med. 1981. V. 43. P. 166. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971494>
 10. Adamska-Szewczyk A., Glowniak K., Baj T. Furocholine alkaloids in plants from Rutaceae family – a review // Curr. Issues Pharm. Med. Sci. 2016. V. 29. P. 33. <https://doi.org/10.1515/cipms-2016-0008>
 11. Kaur R., Kumar K. Synthetic and medicinal perspective of quinolines as antiviral agents // Eur. J. Med. Chem. 2021. V. 215. P. 113220. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113220>
 12. Ghosh S., Bishayee K., Khuda-Bukhsh A.R. Graveoline Isolated from Ethanolic extract of *Ruta graveolens* triggers apoptosis and autophagy in skin melanoma cells: A novel apoptosis-independent autophagic signaling pathway: Graveoline induces apoptosis and autophagy in A375 cells // Phytother. Res. 2014. V. 28. P. 1153. <https://doi.org/10.1002/ptr.5107>
 13. Yadav T.T., Murahari M., Peters G.J., Yc M. A comprehensive review on acridone based derivatives as future anti-cancer agents and their structure activity relationships // Eur. J. Med. Chem. 2022. V. 239. P. 114527. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114527>
 14. Misawa M. Plant issue culture: An alternative for production of useful metabolites. Rome: Food and Agriculture Organization, 1994. 87 p. <https://www.fao.org/3/t0831E/t0831e00.htm#con>
 15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 16. Wagner H., Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. 2nd ed. Berlin; New York: Springer, 1996. 384 p.
 17. Orłita A., Sidwa-Gorycka M., Kumirska J., Malinski E., Siedlecka E.M., Gajdus J., Lojkowska E., Stepnowski P. Identification of *Ruta graveolens* L. metabolites accumulated in the presence of abiotic elicitors // Biotechnol. Prog. 2008. V. 24. P. 128.
 18. Diamond D., Lau K. T., Brady S., Cleary J. Integration of analytical measurements and wireless communications—Current issues and future strategies // Talanta. 2008. V. 75. P. 606. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.022>
 19. Saad B. Ion-association method for the spectrophotometric determination of the antitussive drug noscipine // Talanta. 1997. V. 44. P. 53. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(96\)02009-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(96)02009-7)
 20. Zhu S.-C., Shi M.-Z., Yu Y.-L., Jiao Y.-H., Zheng H., Liu F.-M., Cao J. In-situ formation of ion pair assisted liquid-liquid microextraction of natural alkaloids by response surface methodology // Microchem. J. 2021. V. 171. P. 106813. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106813>
 21. Gainza A.H. Reaction of halogenated hydrocarbon solvents with tertiary amines: Spectrophotometric and conductimetric study // Int. J. Chem. Kinet. 2004. V. 36. P. 500. <https://doi.org/10.1002/kin.20022>
 22. Shamsa F., Monsef H.R., Ghamooshi R., Verdian-rizi R. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants // Thai J. Pharm. Sci. 2008. V. 32. P. 17.
 23. Gaiñza A.H. Associations of ajmaline and homatropine with bromocresol green and bromophenol blue in dichloromethane: Thermodynamic and kinetic parameters // Can. J. Chem. 1987. V. 65. P. 1279. <https://doi.org/10.1139/v87-215>
 24. Sakai, T., Ohno N., Sasaki H., Hyuga T. Extraction-spectrophotometric determination of berberine in crude drugs by the formation of a new ion associate // Anal. Sci. 1991. V. 7. P. 39. <https://doi.org/10.2116/analsci.7.39>
 25. Baumert A., Maier W., Schumann B., Gröger D. Increased accumulation of acridone alkaloids by cell suspension cultures of *Ruta graveolens* in response to elicitors // J. Plant Physiol. 1991. V. 139. P. 224. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80612-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80612-7)
 26. Eilert U. Acridones (*Ruta* Alkaloids) // Phytochemicals in Plant Cell Cultures / Eds. Friedrich L., Vasil I.K. Elsevier. 1988. P. 419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715005-5.50031-5>
 27. Kuzovkina I.N. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens* // Phytochemistry. 2004. V. 65. P. 1095. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.003>
 28. Кузовкина И.Н., Чернышева Т.П., Альтерман И.Е. Характеристика штамма каллусной ткани Руты душистой, продуцирующей рутакиридон // Физиология растений. 1979. Т. 26. С. 492.
 29. Ramawat K.G., Rideau M., Chenieux J.-C. Growth and quaternary alkaloid production in differentiating and non-differentiating strains of *Ruta graveolens* // Phytochemistry. 1985. V. 24. P. 441. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80743-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80743-8)
 30. Zhang N., Wang M., Li Y., Zhou M., Wu T., Cheng Z. TLC–MS identification of alkaloids in *Leonuri herba* and *Leonuri fructus* aided by a newly developed universal derivatisation reagent optimised by the response surface method: 3 // Phytochem. Anal. 2021. V. 32. P. 242. <https://doi.org/10.1002/pca.2970>
 31. Кузовкина И.Н., Сендереи К., Роса С., Райш И. Состав алкалоидов изолированных корней, каллусных тканей и суспензии клеток *Ruta graveolens* L. // Растительные ресурсы. 1980. Т. 16. С. 112.