



Журналу 70 лет!

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 71, номер 3, 2024

ОБЗОРЫ

- Белки теплового шока в иммунитете растений
Т. Н. Шафикова, Л. А. Максимова, Ю. В. Омеличкин 259

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Экспрессия генов циркадных ритмов, активность фотосистем и биосинтез каротиноидов в проростках двух инбредных линий кукурузы в условиях измененного фотопериода
Д. Х. Архестова, О. К. Анисимова, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова 268
- Совместное действие brassinosteroidов и феруловой кислоты на начальный рост растений яровой пшеницы
Н. Е. Манжелесова, Р. П. Литвиновская, А. Л. Савчук, Д. В. Денисюк, В. А. Хрипач 280
- Влияние соотношения красного и дальнего красного света на рост, содержание пигментов и интенсивность фотосинтеза у кресс-салата
Т. Н. Лисина, О. А. Четина, В. А. Парфенкова, О. В. Бурдышева, Е. С. Шолгин 292
- Изолированные культуры зеленых корней *Triticum aestivum* L. способны к неограниченному росту на безгормональных питательных средах
В. М. Александрова, Г. Р. Гумерова, Х. Г. Мусин, З. А. Бережнева, А. А. Галимова, Б. Р. Кулуев 299
- Особенности роста и накопления полифенольных соединений в каллусных культурах лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* MILL.)
П. А. Иванов, В. А. Хабаров, Д. А. Некрасова, Н. С. Пивоварова, А. К. Уэйли, М. Н. Повыдыш 311
- Специфика роста и накопления флавоноидов у растений и клеточных культур *Luchnis chalcidonica*, полученных от эксплантов разных органов
И. Ф. Головацкая, Ю. В. Медведева, М. К. Кадырбаев, Е. В. Бойко 320
- Особенности формирования повышенной холодоустойчивости пшеницы под влиянием наночастиц золота
Ю. В. Венжик, А. Н. Дерябин, К. В. Жукова, А. О. Соколов, В. Н. Попов, И. Е. Мошков 333
- Влияние окислительного стресса на липидный состав рафтовых структур вакуолярной мембраны
Н. В. Озолина, И. С. Капустина, В. В. Гурина, Е. В. Спиридонова, В. Н. Нурминский 346
- Физиолого-биохимические реакции *Sorghum bicolor* на бактеризацию и воздействие поллютантов
О. В. Турковская, А. Д. Бондаренкова, С. Н. Голубев, Н. Н. Позднякова, Е. В. Дубровская, И. Ю. Сунгурцева, А. Ю. Муратова 356

УДК 581.1

БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА В ИММУНИТЕТЕ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. Т. Н. Шафикова^{а,*}, Л. А. Максимова^а, Ю. В. Омеличкина^а^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

*e-mail: t-shafikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.12.2023 г.

После доработки 03.03.2024 г.

Принята к публикации 09.03.2024 г.

Белки теплового шока (БТШ) широко распространены среди прокариотических и эукариотических организмов, при этом их функция не ограничивается защитой от температурного воздействия. БТШ выявляются не только при абиотическом стрессе широкого спектра, но и при биотическом. Им свойственна общая универсальная роль в качестве шаперонов для поддержания функционирования белковых молекул. В обзоре приводятся данные, свидетельствующие об участии представителей каждого семейства БТШ в развитии защитной реакции растений против фитопатогенов. БТШ активируются на разных уровнях защиты растения от патогенов: как на уровне неспецифического паттерн-активируемого, так и на уровне специфического эффектор-активируемого иммунитета. Немаловажно взаимодействие БТШ с участниками клеточных сигнальных каскадных систем, осуществляющих контроль за правильным и своевременным созреванием, сборкой и, при необходимости, деградацией белковых молекул. Рассмотрение участия БТШ в иммунитете растений несомненно заслуживает внимания специалистов в области фитоиммунологии.

Ключевые слова: МАР-индуцируемый иммунитет, РТИ-индуцируемый иммунитет, белки теплового шока, врожденный иммунитет, иммунитет растений, стрессовые белки

DOI: 10.31857/S0015330324030015, EDN: NNCDDT

ВВЕДЕНИЕ

Любой вид стрессового воздействия на организм вызывает запуск защитных механизмов, в том числе активацию/индукцию синтеза стрессовых белков, среди которых белки теплового шока (БТШ), которые изначально получили такое название по причине воздействия так называемого “теплового шока” или повышенных, но не критических для жизнедеятельности организма температур. В дальнейшем было определено, что БТШ являются ключевыми компонентами поддержания клеточного гомеостаза в оптимальных и стрессовых условиях в прокариотической и эукариотической клетках. Известно, что БТШ ответственны за созревание (процессинг) белковых молекул – фолдинг, сборку, транслокацию и деградацию белков в процессах роста и развития клетки [1–4]. БТШ принимают также участие в процессах стабилизации белковых молекул [5, 6].

У растений БТШ впервые были обнаружены в 1980 году. Как и у других организмов, БТШ рас-

тений множественны: они представлены группами как высокомолекулярных (110–60 кД), так и низкомолекулярных (35–15 кД) белков [7–10]. В настоящее время БТШ как растений, так и животных группируют в семь классов в соответствии с молекулярным весом: “большие”, такие как Hsp110, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 и “малые” белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsps) [4, 10]. Преимущественно белки БТШ локализуются в цитоплазме и принимают участие в защитных реакциях при абиотических и биотических стрессовых воздействиях. Кроме того, присутствие и функциональная активность БТШ зафиксирована и в других клеточных органеллах, таких как эндоплазматический ретикулум, хлоропласты, митохондрии и ядро [9, 11]. Установлено, что транскрипция генов белков теплового шока контролируется регуляторными белками, названными транскрипционными факторами теплового шока (heat stress transcription factors, Hsfs) [12].

Кроме теплового воздействия, индукция или активация БТШ в клетках различных организмов также обнаружена и при действии других абиотических стрессоров – низких температур [13], УФ [14], тяжелых металлов [15], при оксидативном стрессе и поранениях растений

Сокращения: ЕТИ – иммунитет, индуцируемый эффекторами (от effector-triggered immunity), МАР – патогенные молекулярные структуры (от microbial-associated molecular patterns), РТИ – иммунитет, индуцируемый патогенными молекулярными структурами (от patterns-triggered immunity).

Arabidopsis thaliana [16], при засухе и осмотическом стрессе [17, 18]. Механизмы и роль БТШ в ответе растений на перечисленные стрессовые воздействия активно изучаются в настоящее время. Так, экспериментально установлено влияние БТШ на развитие индуцированной термотолерантности растений [19] и дрожжей [20]. В работах последнего десятилетия БТШ стали относить к группе так называемых белков-совместителей (moonlighting proteins) [21, 22]. Белки-совместители — это белки, выполняющие несколько функций, при этом такая их возможность не связана с альтернативным сплайсингом, присутствием гомологичных белков или реализацией одних и тех же биохимических функций в разных клеточных процессах. БТШ и Hsfs (heat shock transcription factors), как предполагается, являются молекулярной основой феномена кросс-толерантности у растений [16].

Как оказалось, биотические стресс-факторы, такие как патогенные микроорганизмы, также влияют на изменение активности различных видов БТШ. Так, было выявлено участие БТШ в развитии иммунных реакций на патогены у животных организмов, которое, как установили исследователи, заключалось в активации адаптивного иммунитета — перехвате антигенных пептидов и их репрезентации, а также созревании и активации дендроцитов и лимфоцитов [23–25]. Участие БТШ в реакциях врожденного иммунитета у организмов животных подтверждается установлением факта взаимодействия БТШ с PRR-рецепторами, распознающими консервативные микробные структуры, называемые патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)), в частности, было установлено взаимодействие БТШ с Toll-подобными рецепторами (TLR) [26, 27]. После появления подобных работ ученые стали пристально изучать роль БТШ в процессах врожденного иммунитета и у растительных организмов. Удалось экспериментально установить, что инфицирование патогеном растительного организма приводит к индукции синтеза БТШ Hsp70, Hsp90, и Hsp100 семейств [28–30].

Семейство малых БТШ

Молекулярный вес белков семейства малых БТШ варьирует от 12 до 43 кД, эту группу белков также называют β БТШ (HspB) [31]. Для всех малых БТШ характерно наличие консервативного кристаллинового домена, впервые обнаруженного в α -кристаллине [32]. Считается, что димерный кристаллиновый домен обеспечивает реализацию их основных функций — малые БТШ, как и представители других семейств, функционируют в качестве молекулярных шаперонов, предотвращая нежелательные белок-белковые

взаимодействия и способствуя рефолдингу денатурированных белков [4, 33]. Участие малых БТШ в иммунных реакциях растений активно изучается. К настоящему времени установлено, что белок *Solanum lycopersicum* LRS12, относящийся к Hsp20, специфически взаимодействует с I-2 — внутриклеточным рецептором семейства NB-LRR, что обеспечивает устойчивость растений томата при их инфицировании патогеном *Fusarium oxysporum* [34].

Выявлен еще один белок данного семейства NtsHsp17 (Hsp17 *Nicotiana tabacum*), который участвует в развитии устойчивости растений при инфицировании *Ralstonia solanacearum*. Так, инфицирование растений *R. solanacearum* вызвало активацию экспрессии (*NtsHsp17*), что, вероятно, и определяло развитие устойчивости растений к патогену, в то время как сайленсинг *NtsHsp17* способствовал развитию симптомов заболевания [28, 35]. Аналогичная тенденция наблюдалась в растениях томата при сайленсинге HSP17.6 и инфицировании *Rhizopus nigricans* [36].

В работах групп ученых, посвященных изучению экспрессии Hsp20 в различных фитопатосистемах, было показано, что нокдаун Hsp20 в присутствии PR белков приводил к проявлению вирулентности даже у непатогенного штамма *R. solanacearum* [28]. Также было показано участие Hsp20 в развитии устойчивости против совместимых и несовместимых штаммов бактерий *Xanthomonas campestris* у растений перца и апельсина, что, по мнению исследователей, может свидетельствовать об участии Hsp20 в развитии механизмов врожденного иммунитета растений [37].

В другой фитопатосистеме показано непосредственное взаимодействие БТШ ячменя *Hordeum vulgare* с эффекторными молекулами патогенов. Установлено, что белки Hsp16.5 и Hsp17.5 этих растений взаимодействуют с эффекторами CSEP0105 и CSEP0162 возбудителя мучнистой росы *Blumeria graminis f. sp. hordei*, при этом шаперонная активность данных белков снижается. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что БТШ данного семейства могут выступать в качестве белков-мишеней для эффекторов фитопатогенов [38].

Белки семейства HSP40

Белки семейства Hsp40 содержат консервативный J-домен из 70 аминокислот, поэтому нередко их называют J-белками, полное название семейства Hsp40/DnaJ. Консервативный J-домен обеспечивает физическое взаимодействие с нуклеотид-связывающим доменом (NBD) белков семейства Hsp70, что определяет функционирование Hsp40 в качестве ко-шаперонов Hsp70 [39]. Работы, посвященные определению роли Hsp40 в иммунитете растений, свидетель-

ствуют об участии белков данного семейства в защите от вирусных инфекций. Так, показано, что сайленсинг Hsp40 усиливает восприимчивость растений сои *Glycine max* к вирусу мозаики, в то время как сверхэкспрессия данного белка вызывает СЧ-подобную клеточную смерть в результате реакции сверхчувствительности, однако молекулярные механизмы функционирования Hsp40 в иммунитете растений практически не изучены [40].

В ряде работ показано, что Hsp40 совместно с Hsp70 могут облегчать передвижение (транспортировку) вирусных частиц, способствуя патогенезу. Оба шаперона взаимодействуют с белком оболочки вируса, связывая вирион, что способствует передвижению вируса из цитозоли (или ядра) к мембране или плазмодесмам между двумя клетками, приводя к более быстрому и интенсивному развитию симптомов инфицирования [41]. Описанный механизм реализуется при взаимодействии DnaJ-подобных белков табака NtCPIP с белком оболочки вируса картофеля Y [42]. Сходным образом транспортный белок вируса пятнистости томата взаимодействует с DnaJ-подобным белком табака NtDnaJ [43].

Семейство Hsp70

Hsp70 представляют собой АТФ-зависимые шапероны, которые имеют три домена: консервативный N-концевой домен АТФазы длиной ~44 кД (также называемый нуклеотид-связывающим доменом; NBD), субстрат-связывающий домен размером ~18 кД (SBD) и вариабельный C-конец ~10 кД. Для выполнения своих функций белки Hsp70 нуждаются в двух ко-шаперонах – это J-белки (Hsp40) и так называемые факторы обмена нуклеотидов (nucleotide exchange factors, NEFs). В качестве этих факторов, как правило, выступают белки Hsp110 [44].

Общепризнано, что белки семейства Hsp70 функционируют в качестве молекулярных шаперонов в фолдинге и рефолдинге белков для предотвращения необратимой агрегации [17, 45] и играют роль в процессах транспорта и конгломерации белков [46]. Вместе с тем белки данного семейства вовлечены во взаимодействие с белками, передающими сигнал, и эти их функции не всегда связаны с функционированием в качестве шаперонов [47]. В последнее время большое количество работ на разных фитопатосистемах посвящено анализу участия белков семейства Hsp70 в механизмах врожденного иммунитета.

Большинство полученных данных свидетельствуют о том, что Hsp70 могут выполнять несколько различных функций при развитии иммунных реакций [17]. Данные одних исследований свидетельствуют в пользу того, что цитозольные белки Hsp70 совместно с Hsp40, способствуют развитию вирусной инфекции

(как было описано выше [42, 43]). Результаты, полученные другими исследователями, позволяют говорить об участии белков Hsp70 в предотвращении развития окислительного взрыва в ходе растительно-микробного взаимодействия. Так, при инфицировании пшеницы (*Triticum aestivum* L.) возбудителем желтой ржавчины *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* оказалось, что для совместимого типа взаимоотношений характерно более раннее увеличение экспрессии Hsp70, чем при несовместимом типе, который также сопровождается увеличением содержания Hsp70, но в более поздние сроки [48]. Функции Hsp70 авторы связывают с предотвращением развития окислительного взрыва, и активация синтеза этого белка регулируется патоген-индуцируемыми сигнальными путями. Так, при действии участника такого сигналинга – метилжасмоната – экспрессия *TaHSC70* увеличивается [48]. В тоже время, в экспериментах по определению изменений в экспрессии генов у подсолнечника при инфицировании этих растений мучнистой росой, было продемонстрировано, что экспрессия белка Hsp70 и ряда других стрессовых белков оказалась наиболее выражена у устойчивых генотипов растений, чем у восприимчивых [49]. В работе Yun с коллегами было установлено, что нагревание плодов мандарина (*Citrus unshiu* Marc.) в течение 5 минут при 52°C приводило к усилению экспрессии БТШ и последующей устойчивости к заражению голубой плесенью (*Penicillium italicum*). Авторы исследования связывают обнаруженный эффект с активацией функционирования Hsp70 в системе контроля фолдинга [50].

В системе табак (*Nicotiana tabacum*) – некротрофный патоген *Ralstonia solanacearum* было показано, что предварительное умеренное тепловое воздействие на растения сопровождается синтезом Hsp70 и способствует развитию несовместимого типа взаимоотношений растения и микроорганизма. Авторы предполагают, что Hsp70 активирует процесс программируемой клеточной гибели, что подтверждается усиленной фрагментацией ДНК при предварительной тепловой обработке [51]. Наряду с этим обнаружено, что Hsp70 может связываться с малыми ГТРазами Ras семейства, которые могут функционировать в качестве основных переключателей двух типов иммунитета: паттерн-активируемого (PTI) и эффектор-активируемого иммунитета (ETI) [52]. Еще одной выявленной функцией Hsp70 в иммунитете растений является участие этого белка в модуляции функционирования MAPK каскада. Так, сверхэкспрессия Hsp70 ингибирует MAPK сигнальный каскад, который задействован в развитии апоптотической гибели клетки [53]. У растений риса также обнаружено, что белок OsctHsp70-1 имеет

функциональную связь с Ras/Raf-связанным MAPK киназным каскадом.

Исследования последних лет показали, что Hsp70 принимает участие в реализации так называемого контроля качества эндоплазматического ретикула (ER quality control (ER-QC)), тем самым принимая опосредованное участие в развитии иммунных реакций растений [55, 56]. Показано, что рецептор Ve1 участвует в запуске защитных реакций растения против грибного патогена *Verticillium dahliae*. Имеются данные, что для функционирования рецептор-подобных белков Ve1 и Cf растений томата, принимающих участие в запуске паттерн-активируемого иммунитета, требуется их корректный фолдинг и гликозилирование [57–59]. Кроме того, должен быть предотвращен транспорт незрелых рецепторов к плазматической мембране, поскольку они могут быть нефункциональны в связывании лиганда и активации сигнальных путей. Вероятнее всего, для осуществления всей необходимой посттрансляционной модификации, для созревания трансмембранных рецепторов и существует система контроля качества ER-QC, в которой задействованы шапероны эндоплазматического ретикула, такие как так называемые белки Bip, к которым относятся белки семейства Hsp70, функционирующие в эндоплазматическом ретикуле и взаимодействующие с Hsp40-подобным белком SDF2 (stromal-derived factor-2) [60]. Главная функция этих шаперонов ER-QC заключается в предотвращении накопления нефункциональных белков путем участия в фолдинге белков и запуске стресса в эндоплазматическом ретикуле [55, 61]. Мутация белков BiP системы контроля ER-QC приводит к отсутствию устойчивости томата к патогену. Эти данные свидетельствуют в пользу участия шаперонов эндоплазматического ретикула в развитии защитных иммунных реакций [62–64]. Приведенные выше результаты, полученные на разных фитопатосистемах и при разных типах взаимодействий организмов (совместимость-несовместимость), противоречивы и неоднозначны и свидетельствуют о том, что белки семейства Hsp70 могут способствовать как развитию иммунных реакций, так и инфицированию растительного организма патогеном.

Семейство Hsp90

Из всех известных белков теплового шока растений участие Hsp90 в развитии иммунных реакций считается наиболее доказанным. Hsp90 в комплексе с ко-шаперон-подобными молекулами RAR1 и SGT1 выполняют ключевую роль в реакциях эффектор-активируемого иммунитета – второй специфической линии защиты растения [65–67]. В иммунных реакциях растений цитозольные Hsp90 принимают участие в сбор-

ке, контроле стабильности и/или активации иммунного рецепторного комплекса. Точечные мутации генов *hsp90.2* и *hsp90.3* риса (*Oryza sativa* L.) приводят к повышенному содержанию иммунных рецепторов, включая SNC1, RPS2 и RPS4 и определяют усиленную устойчивость этих растений к заболеваниям. Объясняется это тем, что Hsp90 совместно с белком SGT1 участвуют в формировании SCF E3 убиквитин-лигазного комплекса, который метит иммунные рецепторы для дальнейшей их деградации. Такая регуляция имеет решающее значение в ограничении количества иммунных рецепторов, что позволяет избегать развития аутоиммунных реакций [3, 68]. В других работах было показано, что *in vitro* SGT1 может взаимодействовать с белком SKP1 и связываться в таком состоянии с Hsp90, образуя ко-шаперонный комплекс [69, 70]. Исследования функций комплекса SCF показали, что он регулирует стабильность R-белков, что свидетельствует о вовлечении Hsp90 в реакции эффектор-активируемого иммунитета [71].

Семейство Hsp100

Среди белков семейства Casein lytic proteinase/heat shock protein 100 (Clp/Hsp100), которые являются шаперонами, участвующими в разборке и реконструировании белковых комплексов с затратой энергии АТФ, наиболее изученным является белок Hsp101. Белок Hsp 101 совместно с белками семейства sHsp и Hsp70 обеспечивают дезагрегацию цитотоксических белковых агрегатов. Помимо цитозольного Hsp101 к этому семейству относятся белки ClpB-p и ClpB-m, имеющие хлоропластную и митохондриальную локализацию соответственно. Широко известно, что цитозольный белок Hsp101 необходим для развития индуцированной термотолерантности [72]. Интересно, что, хотя транскрипты всех трех генов (*hot1-3* (Hsp101), *clpB-p* и *clpB-m*) накапливаются при действии высоких температур, белки ClpB-p и ClpB-m не участвуют в развитии индуцированной термотолерантности. Вместе с тем мутация гена ClpB-p вызывает нарушения синтеза хлорофилла и развития хлоропластов [73, 74]. Кроме существенной роли в развитии индуцированной термотолерантности, у *A. thaliana* Hsp101 обеспечивает повышение продуктивности растений при нормальных условиях роста. Выключение гена белка Hsp101 приводит к уменьшению количества семян, сроков прорастания, общей сухой массы и количества соцветий, к увеличению интенсивности транспирации [75]. Белки семейства Hsp101 функционируют в виде гомогексомеров. Механизм дезагрегации белков включает в себя гидролиз АТФ с одновременным развертыванием неправильно свернутого белка, протягивание развернутого полипептида через центральную

пору, и рефолдинг в сочетании с другими молекулярными шаперонами. Последние работы показывают, что Hsp 101 структурно взаимодействуют с протеосомами, осуществляя процесс деградации убиквитинированных белков [76].

Кратковременные воздействия умеренно повышенных температур (37°–39°C), а также трансгенные манипуляции вызывали увеличение количества белка Hsp101 в клетках растений и суспензионных культур клеток табака [77]. При последующем воздействии фитопатогенных бактерий *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) на культуру трансгенных клеток табака сверхэкспрессия Hsp101 привела к снижению эффективности защитных реакций по сравнению с обычными культурами. Аналогичное снижение эффективности защитного ответа на инфицирование патогеном *Cms* наблюдалось после умеренной тепловой обработки, что вызывало повышение экспрессии Hsp101 и приводило к менее интенсивной генерации АФК в растительных клетках. Процент гибели клеток в ходе реакции сверхчувствительности – важнейшей реакции эффектор-активируемого иммунитета – также был ниже у табака, трансформированного геном *hsp101* [77]. При этом необходимо обратить внимание на тот факт, что повышенная экспрессия гена *hsp101* Hsp 101 (при трансформации табака) не влияла на выживаемость клеток при культивировании с *E. coli* – нетипичного для растений патогена, который не вызывает активацию специфических защитных реакций в клетках табака. Усиленная экспрессия *hsp101* Hsp101 в культуре клеток табака также снижала способность растительных клеток подавлять процесс биопленкообразования у фитопатогена *Cms* [78].

Как известно, способность образовывать биопленки является ключевым фактором патогенности у васкулярных фитопатогенов, к которым принадлежит вид бактерий *Cms*. Поэтому менее выраженный ингибирующий эффект трансформированной культуры клеток табака на процесс образования пленок *Cms*, по сравнению с действием на биопленкообразование нетрансформированной культуры, свидетельствует о подавлении защитных реакций иммунитета в растительных клетках с повышенной экспрессией *hsp101* Hsp101. Описанные результаты говорят в пользу того, что белки теплового шока Hsp101 ослабляют развитие реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета.

Приведенные в обзоре данные свидетельствуют о том, что каждый класс белков теплового шока, выполняя свои неспецифические функции в качестве шаперонов, также принимает участие и в определенных механизмах иммунных реакций. Показано участие БТШ на разных уровнях защиты растения от патогенов:

как на уровне неспецифического паттерн-активируемого, так и на уровне специфического эффектор-активируемого иммунитета. Большинство результатов исследований участия БТШ в иммунитете растений сводятся к тому, что белки теплового шока в качестве шаперонов обеспечивают “правильное” функционирование участников защитных реакций, главным образом иммунных рецепторов, осуществляя их корректный и нужный фолдинг, рефолдинг в условиях стресса, своевременную деградацию. Часть исследований также свидетельствует о взаимодействии БТШ с участниками следующего этапа иммунных реакций в клетке – участниками сигнальных каскадов. Вероятно, и на этом этапе БТШ осуществляют контроль данной системы – обеспечивают правильное созревание, рефолдинг и, при необходимости, деградацию белковых молекул. В то же время белки теплового шока способны подавлять реакции иммунитета растения, способствуя развитию патогенеза. Несомненно, вопрос участия БТШ в иммунитете растений требует дальнейшего детального исследования специалистов в области фитоиммунологии. Важно определить роль БТШ в развитии защитного ответа, изучить их функции в иммунных реакциях растений как при развитии совместимых, так и несовместимых взаимоотношений растений и микроорганизмов. Наряду с теоретическими аспектами, большой практический интерес вызывают следующие вопросы: каким образом предварительная термообработка и последующее усиление экспрессии БТШ могут повлиять на резистентность сельскохозяйственных культур к вредителям, а также возможность использования защитных функций БТШ при трансгенезе (инсерции) их генов в геном культурных растений для защиты от патогенов.

В настоящее время, исходя из полученных результатов исследователей различных школ, установлено участие БТШ в функционировании двух уровней врожденного иммунитета растений и показана их связь с рецепторными системами как неспецифического иммунитета, активируемого микробными молекулярными паттернами (pattern-triggered immunity, PTI), так и специфического иммунитета, активируемого эффекторами патогенов (effector-triggered immunity, ETI).

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122041100050-6).

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. Lindquist S. The heat-shock response // Annu. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 1151.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443>
2. Lindquist S., Craig E.A. The heat-shock proteins // Annu. Rev. Genet. 1988. V. 22. P. 631.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>
3. Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response // Trends Plant Sci. 2004. V. 9. P. 244.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
4. Carra S., Alberti S., Arrigo P.A., Benesch J.L., Benjamin I.J., Boelens W., Bartelt-Kirbach B., Brun-del B.J.J.M., Buchner J., Bukau B., Carver J.A., Ecroyd H., Emanuelsson C., Finet S., Golenhofen N. et al. The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions // Cell Stress Chaperones. 2017. V. 22. P. 601.
<https://doi.org/10.1007/s12192-017-0787-8>
5. Whitley D., Goldberg S.P., Jordan W.D. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones // J. Vasc. Sur. 1999. V. 29. P. 748.
[https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(99\)70329-0](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(99)70329-0)
6. Sitia R., Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory // Nature. 2003. V. 426. P. 881.
<https://doi.org/10.1038/nature02262>
7. Войников В.К., Иванова Г.Г., Рудиковский А.В. Белки теплового шока // Физиология растений. 1984. Т. 31. С. 970.
8. Nover L. The heat shock response. London: Taylor & Francis, 1991. 153 p.
9. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. V. 42. P. 579.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.003051>
10. Kidwai M., Singh P., Dutta P., Chawda K., Chakrabarty D. Molecular mechanisms of heat shock proteins for sustainable plant growth and production // Harsh environment and plant resilience / Eds. A. Husen. Springer. 2021. P. 141.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-65912-7_7
11. Boston R.S., Viitanen P.V., Vierling E. Molecular chaperones and protein folding in plants // Plant Mol. Biol. 1996. V. 32. P. 191.
<https://doi.org/10.1007/BF00039383>
12. Al-Whaibi M.H. Plant heat-shock proteins: a mini review // J. King Saud Univ. Sci. 2011. V. 23. P. 139.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022>
13. Kaura V., Malhotra P.K., Mittal A., Sanghera G.S., Kaur N., Bhardwaj R.D., Cheema R.S., Kaur G. Physiological, biochemical, and gene expression responses of sugarcane under cold, drought and salt stresses // J. Plant Growth Regul. 2023. V. 42. P. 6367.
<https://doi.org/10.1007/s00344-022-10850-8>
14. Kim T., Samraj S., Jiménez J., Gómez C., Liu T., Begcy K. Genome-wide identification of heat shock factors and heat shock proteins in response to UV and high intensity light stress in lettuce // BMC Plant Biol. 2021. V. 21. P. 185.
<https://doi.org/10.1186/s12870-021-02959-x>
15. Chaudhary R., Baranwal V.K., Kumar R., Sircar D., Chauhan H. Genomewide identification and expression analysis of Hsp70, Hsp90, and Hsp100 heat shock protein genes in barley under stress conditions and reproductive development // Funct. Integr. Genom. 2019. V. 19. P. 1007.
<https://doi.org/10.1007/s10142-019-00695-y>
16. Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways // BMC Genomics. 2007. V. 8. P. 125.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-125>
17. Aghaie P., Tafreshi S.A.H. Central role of 70-kDa heat shock protein in adaptation of plants to drought stress // Cell Stress Chaperones. 2020. V. 25. P. 1071.
<https://doi.org/10.1007/s12192-020-01144-7>
18. Chatterjee A., Galiba G., Kocsy G., Kumar R., Dey N. Molecular insight into drought tolerance of CR Dhan 40: an upland rice line from Eastern India // J. Crop Sci. Biotechnol. 2023.
<https://doi.org/10.1007/s12892-023-00222-3>
19. Bishnoi A., Jangir P., Shekhawat P.K., Ram H., Soni P. Silicon supplementation as a promising approach to induce thermotolerance in plants: current understanding and future perspectives // J. Soil Sci. Plant Nutr. 2023. V. 23 P. 34.
<https://doi.org/10.1007/s42729-022-00914-9>
20. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Раченко Е.И., Войников В.К. Действие малоната натрия на термотолерантность дрожжей // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 616.
<https://doi.org/10.1023/A:1026087015570>
21. Fares M.A. The evolution of protein moonlighting: adaptive traps and promiscuity in the chaperonins // Biochem. Soc. Trans. 2014. V. 42. P. 1709.
<https://doi.org/10.1042/BST20140225>
22. Henderson B., Martin A.C. Protein moonlighting: a new factor in biology and medicine // Biochem. Soc. Trans. 2014. V. 42. P. 1671.
<https://doi.org/10.1042/BST20140273>
23. Li Z., Menoret A., Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation // Curr. Opin. Immunol. 2002. V. 14. P. 45.
[https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(01\)00297-7](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(01)00297-7)
24. Wallin R.P., Lundqvist A., More S.H., Von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H.G. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system // Trends Immunol. 2002. V. 23. P. 130.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02168-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02168-8)
25. Tsan M.F., Gao B. Heat shock proteins and immune system // J. Leukoc. Biol. 2009. V. 85. P. 905.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0109005>
26. Ohashi K., Burkart V., Flohe S., Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex // J. Immunol. 2000. V. 164. P. 558.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0109005>
27. Vabulas R.M., Ahmad-Nejad P., da Costa C., Miethke T., Kirschning C.J., Hacker H., Wagner H. En-

- doyctosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 31332.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M103217200>
28. *Maimbo M., Ohnishi K., Hikichi Y., Yoshioka H., Kiba A.* Induction of a small heat shock protein and its functional roles in *Nicotiana* plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum* // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. P. 1588.
<https://doi.org/10.1104/pp.107.105353>
 29. *Park Ch.-J., Seo Y.-S.* Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity // *Plant Pathol. J.* 2015. V. 31. P. 323.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>
 30. *Szatmári Á., Zvara Á., Móricz Á.M., Besenyi E., Szabó E., Ott P.G., Puskás L.G., Bozsó Z.* Pattern triggered immunity (PTI) in tobacco: isolation of activated genes suggests role of the phenylpropanoid pathway in inhibition of bacterial pathogens // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. P. e102869.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102869>
 31. *Ceylan, Y., Altunoglu, Y.C., Horuz, E.* HSF and Hsp Gene Families in sunflower: a comprehensive genome-wide determination survey and expression patterns under abiotic stress conditions // *Protoplasma.* 2023. V. 260. P. 1473.
<https://doi.org/10.1007/s00709-023-01862-6>
 32. *Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.В.* Структура и свойства малых белков теплового шока // *Успехи биологической химии.* 2003. Т. 42. С. 59.
 33. *Gupta D., Tuteja N.* Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants // *Plant Signal. Behav.* 2011. V. 6. P. 232.
<https://doi.org/10.4161/psb.6.2.15490>
 34. *Van Ooijen G., Lukasik E., Van Den Burg H.A., Vossen J.H., Cornelissen B.J.C., Takken F.L.W.* The small heat shock protein 20 RSI2 interacts with and is required for stability and function of tomato resistance protein I-2 // *Plant J.* 2010. V. 63. P. 563.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04260.x>
 35. *Zuluaga A.P., Solé M., Lu H., Gongora-Castillo E.* Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild potato *Solanum comersonii* // *BMC Genom.* 2015. V. 16. P. 246.
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1460-1>
 36. *Pan X., Zhu B., Luo Y., Fu D.* Unraveling the protein network of tomato fruit in response to necrotrophic phytopathogenic *Rhizopus nigricans* // *PLoS ONE.* 2013. V. 8: e73034.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073034>
 37. *Garofalo C.G., Garavaglia. B.S., Dunger G., Gottig N., Orellano E.G., Ottado J.* Expression analysis of small heat shock proteins during compatible and incompatible plant-pathogen interactions // *Adv. Stud. Biol.* 2009. V. 5. P. 197.
 38. *Ahmed A.A., Pedersen C., Schultz-Larsen T., Kwaa-itaal M., Jørgensen H.J.L., Thordal-Christensen H.* The barley powdery mildew candidate secreted effector protein CSEP0105 inhibits the chaperone activity of a small heat shock protein // *Plant Physiol.* 2015. V. 168. P. 321.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00278>
 39. *Kampinga H.H., Craig E.A.* The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity // *Nat. Rev.* 2010. V. 11. P. 579.
<https://doi.org/10.1038/nrm2941>
 40. *Liu J.Z., Whitham S.A.* Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance // *Plant J.* 2013. V. 74. P. 110.
<https://doi.org/10.1111/tjp.12108>
 41. *Hafrén A., Hofius D., Rönnholm G., Sonnewald U., Mäkinen K.* HSP70 and its cochaperone CPIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions // *Plant Cell.* 2010. V. 22. P. 523.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.072413>
 42. *Hofius D., Maier A.T., Dietrich C., Jungkunz I., Bornke F., Maiss E., Sonnewald U.* Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for Potato virus Y infection in tobacco plants // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 11870.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01525-07>
 43. *Soellick T., Uhrig J.F., Bucher G.L., Kellmann J.W., Schreier P.H.* The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 2373.
<https://doi.org/10.1073/pnas.030548397>
 44. *Sarkar N.K., Kundnani P., Grover A.* Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*) // *Cell Stress Chaperones.* 2013. V. 18. P. 427.
<https://doi.org/10.1007/s12192-012-0395-6>
 45. *Mayer M., Bukau B.* Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. P. 670.
<https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
 46. *Bush G.L., Meyer D.I.* The refolding activity of the yeast heat shock proteins Ssa1 and Ssa2 defines their roles in protein translocation // *J. Cell Biol.* 1996. V. 135. P. 1229.
<https://doi.org/10.1083/jcb.135.5.1229>
 47. *Pratt W.B., Toft D.O.* Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery // *Exp. Biol. Med.* 2003. V. 228. P. 111.
<https://doi.org/10.1177/153537020322800201>
 48. *Duan Y.H., Guo J., Ding K., Wang S.-J., Zhang H., Dai X.-W., Chen Y.-Y., Govers F., Huang L.-L., Kang Z.-S.* Characterization of a wheat Hsp70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses // *Mol. Biol. Rep.* 2011. V. 38. P. 301.
<https://doi.org/10.1007/s11033-010-0108-0>
 49. *Kallamadi P.R., Dandu K., Kirti P.B., Rao C. M., Thakur S., Mulpuri S.* An insight into powdery mildew-infected, susceptible, resistant and immune sunflower genotypes // *Proteomics.* 2018. V. 18: 1700418.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201700418>

50. Yun Z., Gao H., Liu P., Liu S., Luo T., Jin S., Xu Q., Xu J., Cheng Y., Deng X. Comparative proteomic and metabolomic profiling of citrus fruit with enhancement of disease resistance by postharvest heat treatment // *BMC Plant Biol.* 2013. V. 13. P. 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-44>
51. Byth-Illing H.-A., Bornman L. Heat shock, with recovery, promotes protection of *Nicotiana tabacum* during subsequent exposure to *Ralstonia solanacearum* // *Cell Stress Chaperones.* 2014. V. 19. P. 193. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0445-8>
52. Kawano Y., Akamatsu A., Hayashi K., Housen Y., Okuda J., Yao A., Nakashima A., Takahashi H., Yoshida H., Wong H.L., Kawasaki T., Shimamoto K. Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity // *Cell Host Microbe.* 2010. V. 7. P. 362. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.04.010>
53. Hwang J.R., Zhang C., Patterson C. C-terminus of heat shock protein 70-interacting protein facilitates degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent apoptosis // *Cell Stress Chaperones.* 2005. V. 10. P. 147. <https://doi.org/10.1379/csc-90r.1>
54. Jung K.H., Gho H.J., Nguyen M.X., Kim S.-R., An G. Genome-wide expression analysis of HSP70 family genes in rice and identification of a cytosolic HSP70 gene highly induced under heat stress // *Funct. Integr. Genomics.* 2013. V. 13. P. 391. <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0331-6>
55. Saijo Y. ER quality control of immune receptors and regulators in plants // *Cell Microbiol.* 2010. V. 12. P. 716. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01472.x>
56. Eichmann R., Schafer P. The endoplasmic reticulum in plant immunity and cell death // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 200. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00200>
57. Fradin E.F., Zhang Z., Ayala J.C.J., Castroverde C.D., Nazar R.N., Robb J., Liu C.-M., Thomma B.P.H.J. Genetic dissection of Verticillium wilt resistance mediated by tomato Ve1 // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 320. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136762>
58. Stergiopoulos I., de Wit P.J.G.M. Fungal effector proteins // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2009. V. 47. P. 233. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
59. Song Y., Zhang Zh., Boshoven J.C., Rovenich H., Seidl M.F., Jakše J., Maruthachalam K., Liu C.-M., Subbarao K.V., Javornik B., Thomma B.P.H.J. Tomato immune receptor Ve1 recognizes surface-exposed co-localized N- and C-termini of *Verticillium dahliae* effector Ave1 // *bioRxiv* 103473. 2017. <https://doi.org/10.1101/103473>
60. Schott A., Ravaut S., Keller S., Radzimanowski J., Viotti C., Hillmer S., Sinning I., Strahl S. Arabidopsis stromal-derived Factor2 (SDF2) is a crucial target of the unfolded protein response in the endoplasmic reticulum // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 18113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.117176>
61. Liu J.X., Howell S.H. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants // *Plant Cell.* 2010. V. 22. P. 2930. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078154>
62. Liebrand T.W.H., Kombrink A., Zhang Z., Sklenar J., Jones A.M.E., Robatzek Z., Thomma B.P.H.J., Joosten M.H.A.J. Chaperones of the endoplasmic reticulum are required for Ve1-mediated resistance to *Verticillium* // *Mol. Plant Pathol.* 2014. V. 15. P. 109. <https://doi.org/10.1111/mpp.12071>
63. Vu N.T., Kamiya K., Fukushima A., Hao S., Ning W., Arizumi T., Ezura H., Kusano M. Comparative co-expression network analysis extracts the SIHSP70 gene affecting to shoot elongation of tomato // *Plant Biotechnol.* 2019. V. 36. P. 143. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.19.0603a>
64. Muthusamy S.K., Pushpitha P., Makeskumar T., Sheela M.N. Genome-wide identification and expression analysis of Hsp70 family genes in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) // *Biotech.* 2023. V. 13. P. 341. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03760-3>
65. Thao N.P., Chen L., Nakashima A., Hara S., Umemura K., Takahashi A., Shirasu K., Kawasaki T., Shimamoto K. RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 4035. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055517>
66. Shirasu K. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009. V. 60. P. 139. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092906>
67. Yuan C., Li Ch., Zhao X., Yan C., Wang J., Mou Y., Sun Q., Shan Sh. Genome-wide identification and characterization of HSP90-RAR1-SGT1-Complex members from *Arachis* genomes and their responses to biotic and abiotic stresses // *Front. Genet.* 2021. V. 12. P. 689669. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.689669>
68. Seo Y.S., Lee S.K., Song M.Y., Suh J.-P., Hahn T.-R., Ponal D., Jeon J.-S. The HSP90-SGT1-RAR1 molecular chaperone complex: a core modulator in plant immunity // *J. Plant Biol.* 2008. V. 51. P. 1. <https://doi.org/10.1007/BF03030734>
69. Catlett M.G., Kaplan K.B. Sgt1p is a unique co-chaperone that acts as a client adaptor to link Hsp90 to Skp1p // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 33739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603847200>
70. Xu Z.S., Li Z.Y., Chen Y., Chen M., Li L.C., Ma Y.Z. Heat shock protein 90 in plants: molecular mechanisms and roles in stress responses // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 15706. <https://doi.org/10.3390/ijms131215706>
71. Cheng Y.T., Li Y., Huang S., Huang Y., Dong X., Zhang Y., Li X. Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box(SCF)-mediated protein degradation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 14694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105685108>

72. Hong S.W., Vierling E. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress // *Plant J.* 2001. V. 27. P. 25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01066.x>
73. Lee U., Rioflorido I., Hong S.W., Larkindale J., Waters E.R., Vierling E. The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development // *Plant J.* 2007. V. 49. P. 115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02940.x>
74. Kreis E., Niemeyer J., Merz M., Scheuring D., Schroda M. CLPB3 is required for the removal of chloroplast protein aggregates and thermotolerance in *Chlamydomonas* // *J. Exp. Bot.* 2023. V. 74. P. 3714. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad109>
75. Tonsor S.J., Scott C., Boumaza I., Liss T.R., Brodsky J.L., Vierling E. Heat shock protein 101 effects in *Arabidopsis thaliana*: genetic variation, fitness and pleiotropy in controlled temperatory conditions // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. P. 1614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03690.x>
76. McLoughlin F., Kim M., Marshall R.S., Vierstra R.D., Vierling E. HSP101 interacts with the proteasome and promotes the clearance of ubiquitylated protein aggregates // *Plant Physiol.* 2019. V. 180. P. 1829. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00263>
77. Шаффикова Т.Н., Омеличкина Ю.В., Солдатенко А.С., Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Русалева Т.М., Волкова О.Д. Трансформированная геном *hsp101* культура клеток табака обладает повышенной выживаемостью при заражении *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* // Доклады Академии наук. 2013. Т. 450. С. 621. <https://doi.org/10.7868/S0869565213170271>
78. Omelichkina Y.V., Boyarkina S.V., Shafikova T.N. Effector-activated immune responses in potato and tobacco cell cultures caused by phytopathogen *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 423. <https://doi.org/10.1134/S1021443717020091>

УДК 581.1.575.113.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ, АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМ И БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ В ПРОРОСТКАХ ДВУХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОГО ФОТОПЕРИОДА¹

© 2024 г. Д. Х. Архестова^{a, b}, О. К. Анисимова^a, Е. З. Кочиева^a, А. В. Щенникова^{a, *}^aИнститут биоинженерии Федерального исследовательского центра 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: shchennikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.08.2023 г.

После доработки 27.09.2023 г.

Принята к публикации 01.10.2023 г.

Циркадная система растений как результат адаптационной эволюции тесно связана с чувствительностью их к фотопериоду. Вид *Zea mays* L. исходно принадлежит к короткодневным, при этом современные культивируемые образцы кукурузы считаются нейтральными по отношению к фотопериоду. В работе проанализировано воздействие смены режима длинного дня на ультракороткий день и длинную ночь на уровень транскриптов ключевых генов циркадного ритма (*GIGZ1a*, *GIGZ1b*), фотосистемы I (*psaA*), фотосистемы II (*psbA*) и биосинтеза каротиноидов (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*) в листьях двух средне-позднеспелых инбредных линий кукурузы (Л-5580-1 и Л-5739), сходных по морфофизиологическим характеристикам. В тех же листьях определено содержание хлорофиллов и каротиноидов. Обнаружено, что исследуемые линии существенно различаются по динамике изменения уровня транскриптов генов и содержания пигментов в ответ на смену фотопериода. Уровень транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* у обеих линий возрастает спустя 1 ч после завершения ультракороткого дня и далее характеризуется ростом или падением в зависимости от линии. Экспрессия генов фотосистемы *psaA* и *psbA* различается между линиями, как по уровню, так и по динамике ответа на смену фотопериода. Активность генов каротиногенеза *ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE* и *ORANGE-GREEN* повышается у обеих линий при смене дня ночью (кроме *ZmPSY2* у Л-5580-1) и снижается в разной степени в зависимости от линии к завершению ночного периода. Содержание пигментов спустя 1 ч после смены режима растет у Л-5580-1 и не меняется у Л-5739, а к концу ночи снижается у обеих линий. Полученные данные свидетельствуют о сохранении циркадного ритма у Л-5580-1 и повышенной адаптивности Л-5739 и могут быть использованы для поиска доноров признака высокой адаптивности к изменению фотопериода среди образцов кукурузы.

Ключевые слова: *Zea mays* L., биосинтез каротиноидов, гены фотосистем I и II, кукуруза, фотопериод, циркадные часы, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0015330324030028, EDN: NMZYII

ВВЕДЕНИЕ

Адаптационная эволюция живых организмов, включая растения, привела к появлению циркадной системы, для которой свойственны повторяющиеся колебания в молекулярных процессах с периодом около 24 ч и циклическую “день-ночь”, а также сезонной изменчивостью [1]. Входящий в систему внутренний осциллятор (циркадные часы) синхронизиру-

ется с циклическими процессами окружающей среды с помощью механизмов рецепции поступающих экологических сигналов, что позволяет растению оптимизировать внутренние процессы по отношению к внешним условиям [1]. Как суточные, так и сезонные ритмы находятся в значительной зависимости от фотопериода [2], что отражено в делении растений на длиннодневные (цветут при фотопериоде более 12 ч), короткодневные (менее 12 ч) и нейтральные (инициация цветения не зависит от фотопериода) [3].

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324030028

Молекулярный уровень циркадных часов представлен группой генов, которые регулируют ритмичность экспрессии более 30% транскриптома, как показано на длиннодневном модельном виде *Arabidopsis thaliana* L. [2, 4]. В группу входят гены транскрипционных факторов (ТФ) *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* и *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, утренняя активность которых подавляет экспрессию вечерне-ночных генов *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*, *LUX ARRHYTHMO (LUX)*, *EARLY FLOWERING (ELF) 3* и *ELF4* [2]. Одновременно ТФ CCA1 и LHY стимулируют экспрессию генов семейства *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)*, продукты которых (PRR9 и PRR7), действуя в петле обратной связи, подавляют экспрессию CCA1 и LHY в середине дня. LUX, ELF3 и ELF4 совместно участвуют в репрессии генов PRR9, PRR7, *GIGANTEA (GI)* и *NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED 1 (LNK1)* поздним вечером [2].

ТФ GI считается одним из ключевых участников циркадного осциллятора. Вместе с фоторецептором синего света ZEITLUPE (ZTL, или FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1)) GI контролирует накопление белков TOC1 и PRR [2]. Важность ТФ GI подчеркивается его участием в передаче световых и гормональных сигналов, накоплении хлорофиллов и крахмала, а также определении стрессоустойчивости растений [5–7]. Детализирована роль ТФ GI в контроле экспрессии генов, чувствительных к фитогормону абсцизовой кислоте (АБК), которая участвует в регуляции множества аспектов развития и стрессового ответа растения, а также связанных с этим физиологических реакций [8]. ТФ GI совместно с ТФ ENHANCED EM LEVEL (EEL) связывается с АБК-чувствительным регуляторным элементом в промоторе гена 9-цис-эпоксикаротиноиддиоксигеназы 3 (*NCED3*), положительно регулируя суточный синтез АБК; мутация *gi* приводит к падению содержания АБК за счет снижения уровня транскриптов *NCED3* [9]. Наконец, ТФ GI в комплексе с FKF1 стимулирует экспрессию гена ТФ CONSTANS (CO), индуктора цветения *A. thaliana* при длинном дне [3].

Фотопериод, как параметр циркадной системы, включает регуляторную активность осциллятора по отношению к связанным с фотосинтезом генам белков фотосистемы и биосинтеза каротиноидов. Свидетельством этого служит, к примеру, участие двух из четырех ключевых белковых компонентов реакционных центров фотосинтеза, *psaA* (апопротеины P700 фотосистемы I) и *psbA* (белок D1 фотосистемы II) [10], в адаптации растения к изменениям фотопериода и спектральных характеристик света [11]. На-

глядно продемонстрировано влияние продолжительности фотопериода на накопление каротиноидов и уровень экспрессии генов пути каротиногенеза [12–14]. Соединения каротиноидов (ксантофиллы) выполняют светособирающую функцию в сине-зеленой части солнечного спектра, передавая энергию электронного возбуждения хлорофиллам, и одновременно участвуют в защите молекул хлорофилла от фотоокисления [15]. Помимо этого, накопление важного апокаротиноида АБК регулируется, в частности, ТФ GI [9, 16].

Путь биосинтеза каротиноидов, продуктами которого являются, в том числе, ксантофиллы и АБК, начинается с образования 15-цис-фитоина под воздействием фитоинсинтазы (PSY) [17]. На стадии получения полностью-транс-ликопина происходит разветвление пути: циклизация ликопина приводит к образованию α -каротина (ликопин- ϵ -циклаза LCYE) или β -каротина (ликопин- β -циклаза LCYB) и, далее, ϵ/β - или β/β -ксантофиллов соответственно. β/β -ксантофиллы 9-цис-виолаксантин и 9-цис-неоксантин служат субстратами для образования АБК под воздействием диоксигеназ NCED [18].

Учитывая критичность циркадной системы для всех процессов развития растения, актуально ее изучение у сельскохозяйственных культур. На примере кукурузы (*Zea mays* L. ssp. *mays*) показано, что, как у и длиннодневного *A. thaliana*, воздействие циркадных часов затрагивает около трети транскриптома [19, 20]. При этом *Z. mays* исходно принадлежит к короткодневным видам, а современные культивируемые сорта, линии и гибриды кукурузы считаются нейтральными по отношению к фотопериоду [21, 22].

В отличие от *A. thaliana* в геноме *Z. mays* обнаружено два гена, гомологичных *GI*, *GIGZ1a* и *GIGZ1b*, в некоторых статьях гены названы *ZmGI1* и *ZmGI2* [2, 3]. Пик транскрипции *GIGZ1a* и *GIGZ1b* наблюдается в дневное время; в условиях длинного дня максимум наступает позже, чем при коротком фотопериоде [3]. В противоположность действию гена *GI A. thaliana*, мутация в каждом из двух генов *Z. mays* по отдельности (*GIGZ1a* или *GIGZ1b*) ускоряет цветение кукурузы в условиях длинного дня [23, 24]. Однако функции *GIGZ1a* (*ZmGI1*) и *GI* считаются сходными, поскольку суперэкспрессия *GIGZ1a* у нулевого мутанта *atgi* восстанавливает нормальное время цветения и характер роста *A. thaliana* [23]. Тем не менее, выдвигается предположение, что ТФ GI способствует цветению длиннодневных растений, но подавляет цветение короткодневных видов [2, 23].

Количество генов фитоинсинтазы PSY у *A. thaliana* и *Z. mays* также различается. В геноме *A. thaliana* присутствует один ген PSY [25], а у *Z. mays* их три – *ZmPSY1*, *ZmPSY2* и

ZmPSY3 [26, 27]. Белки *ZmPSY1* и *ZmPSY2* осуществляют основную активность фитоинсинтазы у кукурузы; уровень экспрессии гена *ZmPSY1* положительно связан с накоплением каротиноидов в эндосперме зерна, а также с каротиногенезом в фотосинтезирующей ткани в условиях темноты [28]. Ген *ZmPSY3* активируется в корневой системе кукурузы в ответ на стрессы (засуху, соль, АБК); повышение уровня мРНК *ZmPSY3* положительно коррелирует с накоплением каротиноидов [27].

Каталитическая стабильность фитоинсинтазы *PSY* зависит от взаимодействия фермента с белком *ORANGE (OR)* [29], который представляет собой локализованный в пластидах богатый цистеином шаперон холодазу [30]. Показано участие *OR* в защите растения от стрессовых факторов за счет контроля биосинтеза каротиноидов и АБК, а также за счет прямой стабилизации фотосистемы II [30, 31]. Считается также, что *OR* индуцирует дифференцировку хромопластов, содержащих структуры для накопления каротиноидов [32]. В геноме кукурузы ген *OR* аннотирован как *ORANGE-GREEN* (NCBI Gene ID: 100275801), но практически не исследован. Однако, показано, что суперэкспрессия гена *A. thaliana OR* в трансгенных гибридах кукурузы способствует накоплению каротиноидов [33].

Еще один фермент биосинтеза каротиноидов, критичный для фотозащиты и синтеза АБК – ликопин-ε-циклаза (*LCYE*), активность которого определяет соотношение ксантофиллов виолаксантинового (β/β) и лютеинового (ϵ/β) циклов [17, 18]. В геноме кукурузы *Z. mays* присутствует один ген *LCYE*, активность которого обратно связана с накоплением β -каротина и β -криптоксантина (β/β -ветвь) [34].

В данном исследовании была проведена оценка воздействия изменения фотопериода на содержание хлорофиллов и каротиноидов, а также уровень экспрессии ключевых генов циркадного ритма (*GIGZ1a*, *GIGZ1b*), фотосистем I (*psaA*) и II (*psbA*) и каротиногенеза (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*) в листьях образцов двух инбредных линий кукурузы, обладающих сходными морфофизиологическими характеристиками. Полученные результаты свидетельствуют о зависимости молекулярной регуляции ответа от генотипа *Z. mays*, несмотря на сходство характеристик (группа ФАО по индексу скороспелости, окраска зерна) линий кукурузы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Предметом исследования стали две инбредные линии кукурузы *Z. mays* отечественной селекции (оригинатор – Институт сельского хозяйства Кабардино-Бал-

карского научного центра РАН, КБР, Россия). Обе линии (Л) 5580-1 и 5739 формируют зерна желтой окраски, имеют сходные морфофизиологические характеристики и относятся к средне-позднеспелым (ФАО 300–399); длительность фенологических фаз, включая сроки инициации цветения (чувствительность к фотопериоду), у линий сходные.

Для эксперимента в 2023 г. использовали урожай 2022 г., полученный в полевых условиях ИСХ КБНЦ РАН (с. п. Опытное, Терского района, степная природно-климатическая зона КБР, 43°37'45" с. ш. 44°08'15" в. д.). Период “май–июль” в данной зоне характеризуется длинным днем (14–15 ч) и дневной/ночной температурой 18/12°C (май; стадия проростков), 23/17°C и 27/19°C (июнь и июль: основной рост, цветение, созревание).

Зерна, имеющие правильную форму и окраску, без деформаций и повреждений, просушивали в течение суток на воздухе при комнатной температуре, затем помещали в емкость с водой и опустившиеся на дно образцы использовали для дальнейшей работы. Отобранные зерна выкладывали на марлю (так, чтобы они не соприкасались друг с другом), заливали водой и оставляли на ночь. Утром (спустя 10–12 ч) прорастающие зерна пересаживали в горшки с увлажненным грунтом и выращивали в контролируемых условиях длинного фотопериода (16/8 ч 23/15°C – день/ночь; экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН) до достижения фазы четвертого листа (18–20 дней).

Полученные растения подвергали стрессовому воздействию смены 16-часового дня ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью (далее также упоминается как “темный день”). Затем следовала 8 ч ночь в соответствии с предшествующим режимом. Для анализа (уровень экспрессии генов и содержание хлорофиллов и каротиноидов) отбирали верхние листья в трех временных точках: “4/0” как время перехода день/ночь (4 ч после начала 4-часового дня/0 ч перед 12-часовым “темным днем”), “1” (1 ч после начала “темного дня”) и “12” (12 ч “темного дня”).

Определение уровня генной экспрессии. Из 50 мг ткани верхних листьев растения (стадия четвертого листа; три временные точки) выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit, “QIAGEN”, Германия), очищали от примесей ДНК (RNase-free DNase set, “QIAGEN”, Германия), проверяли на качество (электрофорез в 1.5% агарозном геле) и количество (Qubit® Fluorometer, “Thermo Fisher Scientific”, США) и использовали для синтеза кДНК с праймером oligo-dT (GoScript Reverse Transcription System, “Promega”, США).

Уровень экспрессии генов определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), которую проводили в двух биологических и трех технических повторах на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad Laboratories”, США). В реакцию использовали 3.0 нг кДНК (концентрацию измеряли с помощью Qubit® Fluorometer, “Thermo Fisher Scientific”, США) и смесь для РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green (“Синтол”, Россия). Условия реакции: денатурация (5 мин, 95°C), затем 40 циклов “денатурация (15 с, 95°C) – отжиг/синтез цепи (40 с, 60°C)”. Для нормализации данных РВ-ПЦР использовали референсный ген *Zea mays polyubiquitin* (NM_001329666.1).

Праймеры для РВ-ПЦР разрабатывали на основе геномных данных, доступных в базе NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), с последующей проверкой *in silico* на ген-специфичность в NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для валидации эффективности и специфичности праймеров смесь имеющихся препаратов кДНК в концентрациях 10.0, 1.0 и 0.1 нг на реакцию использовали для тестового РВ-ПЦР (три технических повтора). Критерием эффективности пары праймеров служила кривая плавления, содержащая один пик как подтверждение наработки единственного ампликона. Проведенное тестирование показало 95–100% ($R^2 = 0.943–0.999$) эффективность разработанных праймеров. Последовательности праймеров приведены в таблице S1 (табл. S1. Дополнительные материалы).

Определение содержания каротиноидов и хлорофиллов. В тесте использовали ткани верхних листьев проростков (те же образцы, что для анализа профиля экспрессии генов). Количественную (мг/г сырого веса) оценку содержания хлорофиллов (*a* и *b*) и каротиноидов (общее) в растительной ткани проводили согласно [35] с регистрацией спектров поглощения на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic (“Eppendorf”, Германия).

Структурный и статистический анализ. Для сопутствующего работе структурного анализа последовательностей ДНК (при подборе праймеров) использовали базу данных NCBI, включая программу NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Данные анализов уровней экспрессии генов и содержания пигментов статистически обрабатывали (one-way ANOVA; ‘multiple comparisons, corrected with Bonferroni test’) с помощью программы Graph Pad Prism v. 9 (<https://www.graphpad.com>, США) на основе двух биологических и трех технических повторов при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Несмотря на то, что современные сорта, линии и гибриды кукурузы считаются нейтральными по отношению к фотопериоду, они продолжают делиться по срокам цветения/спелости (ФАО от 100 до 700). Для работы мы выбрали две инбредные линии *Z. mays*, Л-5580-1 и Л-5739, которые по срокам спелости занимают среднее положение среди ранних и поздних линий (средне-спелые, ФАО 300–399), а также сходны по другим морфофизиологическим характеристикам, включая желтую окраску зерна. Это предполагает отсутствие серьезных различий в чувствительности к изменениям фотопериода и регуляции биосинтеза каротиноидов.

При проращивании отобранные семена Л-5580-1 и Л-5739 свежего урожая показали 100% всхожесть. Скорость роста растений была одинакова, как и срок наступления фазы четвертого листа (18–20 дней после прорастания семян). Исходно линии получены селекционерами КБР, где в период вегетации кукурузы день составляет более 12 ч. Поэтому для культивации растений были использованы условия длинного фотопериода (16 ч).

По достижении фазы четвертого листа растения были перенесены в условия, когда 16-часовой день был заменен на 4-часовой день и 12-часовую ночь, то есть завершение 16-часового дня предшествующего режима соответствовало концу ночи. Для сохранения ассоциации в тексте 12-часовая ночь названа “темным днем”. Индивидуальная реакция различных линий кукурузы на изменения в фотопериоде предполагает, что кратковременные модификации суточного ритма способны вызвать резкое изменение уровней транскриптов генов и, следовательно, перспективны для функциональной оценки генов. Подобные стрессы ранее использованы в анализе дифференциальной экспрессии генов биосинтеза каротиноидов при 24-часовом облучении светом (в том числе, разного спектра) этиолированных проростков *Z. mays* [28] и при переносе проростков *Vigna radiata* в условия постоянного света, смены дня и ночи (12/12 ч, день/ночь) и постоянной темноты [36].

Для оценки воздействия смены фотопериода в листьях растений двух линий кукурузы был определен уровень экспрессии ключевых генов циркадного ритма (*GIG1a*, *GIG1b*), фотосистем I (*psaA*) и II (*psbA*) и каротиногенеза (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*), а также было измерено содержание хлорофиллов (*a* и *b*) и суммы каротиноидов. Были выбраны временные точки измерения: “4/0” (4 ч после начала 16-часового дня предыдущего режима = 0 ч перед стрессовой сменой дня ночью; ультракороткий 4-часовой день); “1” (1 ч после

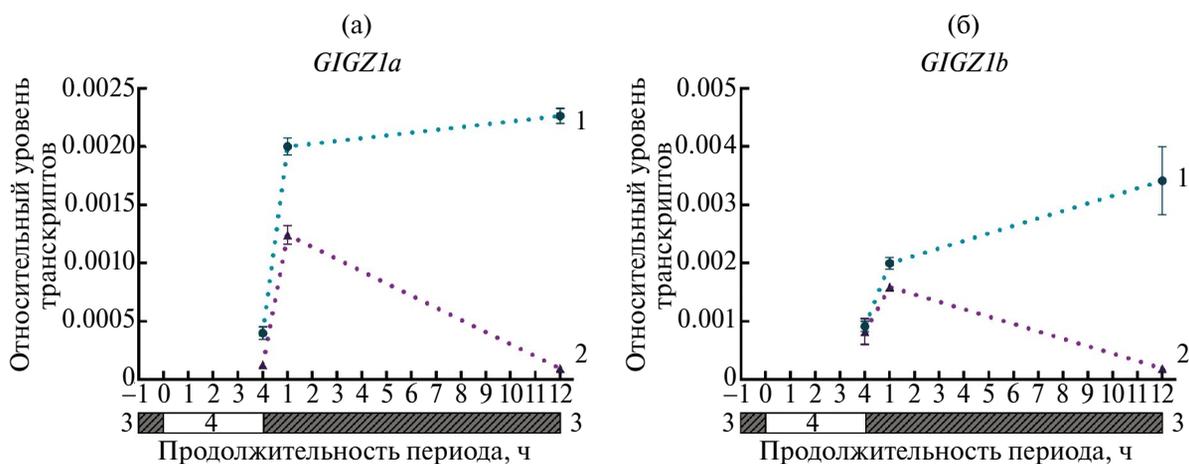
начала “темного дня”); “12” (12 ч после начала “темного дня”; длинная ночь).

Анализ экспрессии целевых генов показал, что реакция генов циркадного ритма на смену фотопериода различается между линиями. Во всех трех точках измерения уровень транскриптов *GIGZ1a* был существенно выше у Л-5580-1, чем у Л-5739. У обеих линий экспрессия гена резко выросла в точке “1”, тогда как в точке “12” она повысилась (Л-5580-1) или снизилась до исходного значения (Л-5739) (рис. 1а). При одинаковом для линий исходном уровне транскриптов *GIGZ1b*, динамика экспрессии гена была сходна с профилем *GIGZ1a*. В точке “1” уровень транскриптов *GIGZ1b* существенно вырос у обеих линий. В точке “12” экспрессия усилилась у Л-5580-1 и резко снизилась у Л-5739 (в ~14 раз в сравнении с “1”) (рис. 1б). Если сопоставлять активность генов между собой для

индивидуальной линии, то в точке “4/0” гены *GIGZ1a* и *GIGZ1b* характеризовались сходным уровнем экспрессии у Л-5739, в то время как у Л-5580-1 уровень транскриптов *GIGZ1b* был в ~2 раза выше, чем *GIGZ1a* (рис. 1а, б).

В случае генов белков фотосистем I и II, уровень экспрессии *psaA* и *psbA* в точках “4/0” и “1” в проростках Л-5580-1 был значительно (~1.5–2 раза) ниже, чем у Л-5739. Однако в точке “12” наблюдалась прямо противоположная ситуация (рис. 2а, б). По отношению к значению “4/0”, в точке “1” уровень транскриптов снизился незначительно (*psaA* у Л-5580-1) или существенно (*psaA* у Л-5739, *psbA* у обеих линий). В точке “12” уровень транскриптов вернулся к исходному у Л-5580-1 (оба гена) и резко упал в ~4 (*psaA*) и ~7 (*psbA*) раз (vs. “4/0”) у Л-5739 (рис. 2а, б).

Профиль экспрессии генов каротиногенеза также различался между исследуемыми линиями.



(в)

		<i>GIGZ1a</i>	<i>GIGZ1b</i>
Л-5580-1	4/0 vs. 1	<0.0001	<0.0001
	4/0 vs. 12	<0.0001	<0.0001
	1 vs. 12	<0.0001	<0.0001
Л-5739	4/0 vs. 1	<0.0001	<0.0001
	4/0 vs. 12	>0.9999	<0.0001
	1 vs. 12	<0.0001	<0.0001
Л-5580-1 vs. Л-5739	4/0 vs. 4/0	<0.0001	>0.9999
	1 vs. 1	<0.0001	0.0268
	12 vs. 12	<0.0001	<0.0001

Рис. 1. Результаты РВ-ПЦР анализа профиля экспрессии генов *GIGZ1a* (а) и *GIGZ1b* (б) в листьях проростков кукурузы (линии 5580-1 и 5739) в ответ на смену 16-часового фотопериода ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью. Значения $P < 0.05$ (в) соответствуют значимым различиям уровня транскриптов генов между точками замера (“4/0”, “1”, “12”) у каждой линии, а также в аналогичных точках между линиями. 1 – Л-5580-1, 2 – Л-5739, 3 – ночь, 4 – день.

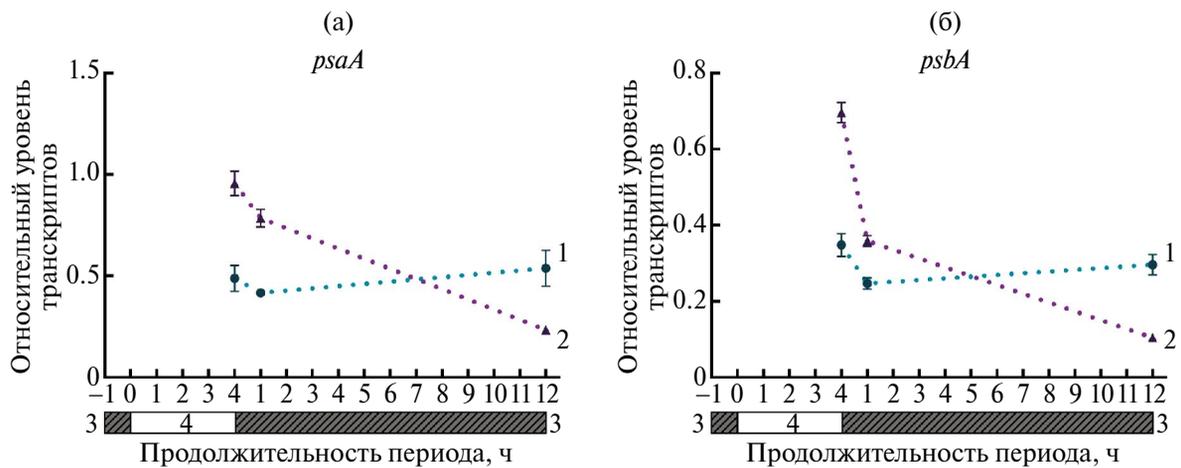
Уровень транскриптов *ZmPSY1*, исходно равный у линий, одинаково резко возрастает (в ~2 раза) в точке “1” у обеих линий, а в точке “12” снижается незначительно (Л-5580-1) или существенно (Л-5739) (рис. 3а). Уровень транскриптов *ZmPSY2* в листьях Л-5580-1 исходно более высок, чем у Л-5739, и в точках “1” и “12” не меняется. В то же время, в листьях Л-5739 экспрессия гена в ~4 раза возрастает в точке “1”, а в точке “12” резко падает почти до исходного (“4/0”) значения (рис. 3б). Таким образом, у Л-5739 оба гена, *ZmPSY1* и *ZmPSY2*, отреагировали на смену условий фотопериода значительным ростом (точка “1”) и падением (“12”) активности, в то время как у Л-5580-1 подобный ответ наблюдался только для гена *ZmPSY1* (рис. 3а, б).

Начальный (“4/0”) уровень экспрессии гена *ZmLCYE* в проростках Л-5580-1 был в ~4 раза выше, чем у Л-5739. У обеих линий в точке “1”

он вырос (в ~2–6 раз в зависимости от линии) и в точке “12” снизился несущественно (Л-5580-1) или значительно (Л-5739). Таким образом, динамика ответа на смену фотопериода у линий сопоставима, однако в случае Л-5739 значительно более выражена, при этом уровень транскриптов в точке “1” у линий практически совпадает (рис. 3в).

Уровень транскриптов гена *ORANGE-GREEN*, равный у линий в точке “4/0”, одинаково резко возрастает (в ~3 раза) в точке “1” у обеих линий и в точке “12” снижается в ~2 (Л-5580-1) и ~4 (Л-5739) раза (рис. 3г).

Биохимический анализ листовой ткани растений Л-5580-1 и Л-5739 показал, что содержание хлорофиллов *a* и *b* в исходной точке, сходное между линиями, в ответ на изменение фотопериода в точке “1” резко растет у Л-5580-1 и не меняется у Л-5739, а в точке “12” снижается у обеих



(в)

		<i>psaA</i>	<i>psbA</i>
Л-5580-1	4/0 vs. 1	0.1279	<0.0001
	4/0 vs. 12	0.8136	<0.0001
	1 vs. 12	0.0003	0.0002
Л-5739	4/0 vs. 1	<0.0001	<0.0001
	4/0 vs. 12	<0.0001	<0.0001
	1 vs. 12	<0.0001	<0.0001
Л-5580-1 vs. Л-5739	4/0 vs. 4/0	<0.0001	<0.0001
	1 vs. 1	<0.0001	<0.0001
	12 vs. 12	<0.0001	<0.0001

Рис. 2. Результаты РВ-ПЦР анализа профиля экспрессии генов *psaA* (а) и *psbA* (б) в листьях проростков кукурузы (линии 5580-1 и 5739) в ответ на смену 16-часового фотопериода ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью. Значения $P < 0.05$ (в) соответствуют значимым различиям уровня транскриптов генов между точками замера (“4/0”, “1”, “12”) у каждой линии, а также в аналогичных точках между линиями. 1 – Л-5580-1, 2 – Л-5739, 3 – ночь, 4 – день.

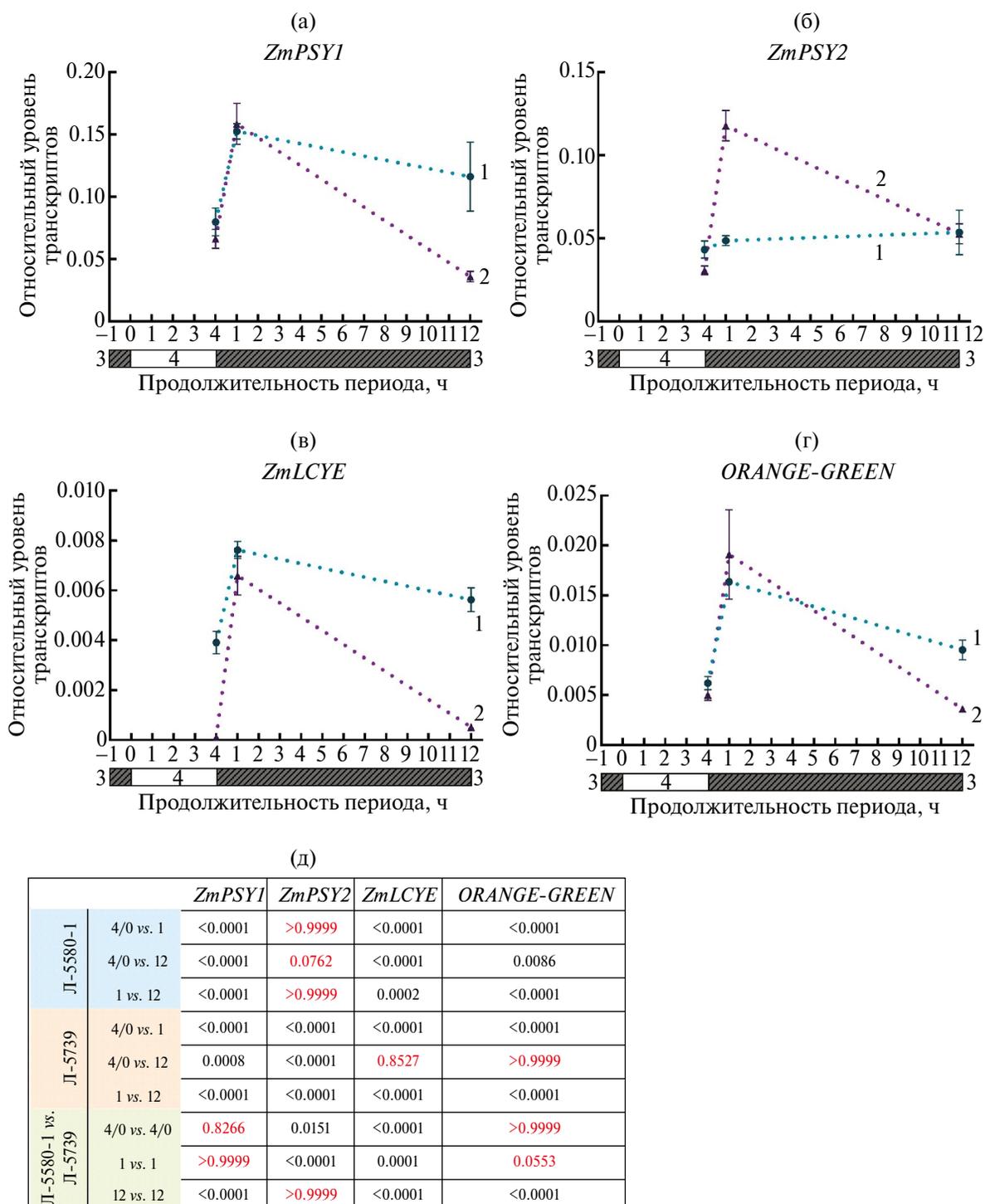


Рис. 3. Результаты РВ-ПЦР анализа профиля экспрессии генов *ZmPSY1* (а), *ZmPSY2* (б), *ZmLCYE* (в) и *ORANGE-GREEN* (г) в листьях проростков кукурузы (линии 5580-1 и 5739) в ответ на смену 16-часового фотопериода ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью. Значения $P < 0.05$ (д) соответствуют значимым различиям уровня транскриптов генов между точками замера (“4/0”, “1”, “12”) у каждой линии, а также в аналогичных точках между линиями. 1 – Л-5580-1, 2 – Л-5739, 3 – ночь, 4 – день.

линий до значений существенно ниже исходных (рис. 4а, б). Содержание суммы каротиноидов в точке “4/0” выше у Л-5580-1 в сравнении с Л-5739 и показывает сходную с хлорофиллами динамику реакции на смену фотопериода. А именно, в точке “1” количество каротиноидов существенно

возрастает (в ~1.5 раза) в листьях Л-5580-1 и не меняется у Л-5739; в точке “12” сумма каротиноидов снижается у обеих линий до значений существенно ниже начальных (рис. 4в).

Таким образом, было показано, что, несмотря на сходство морфофизиологических

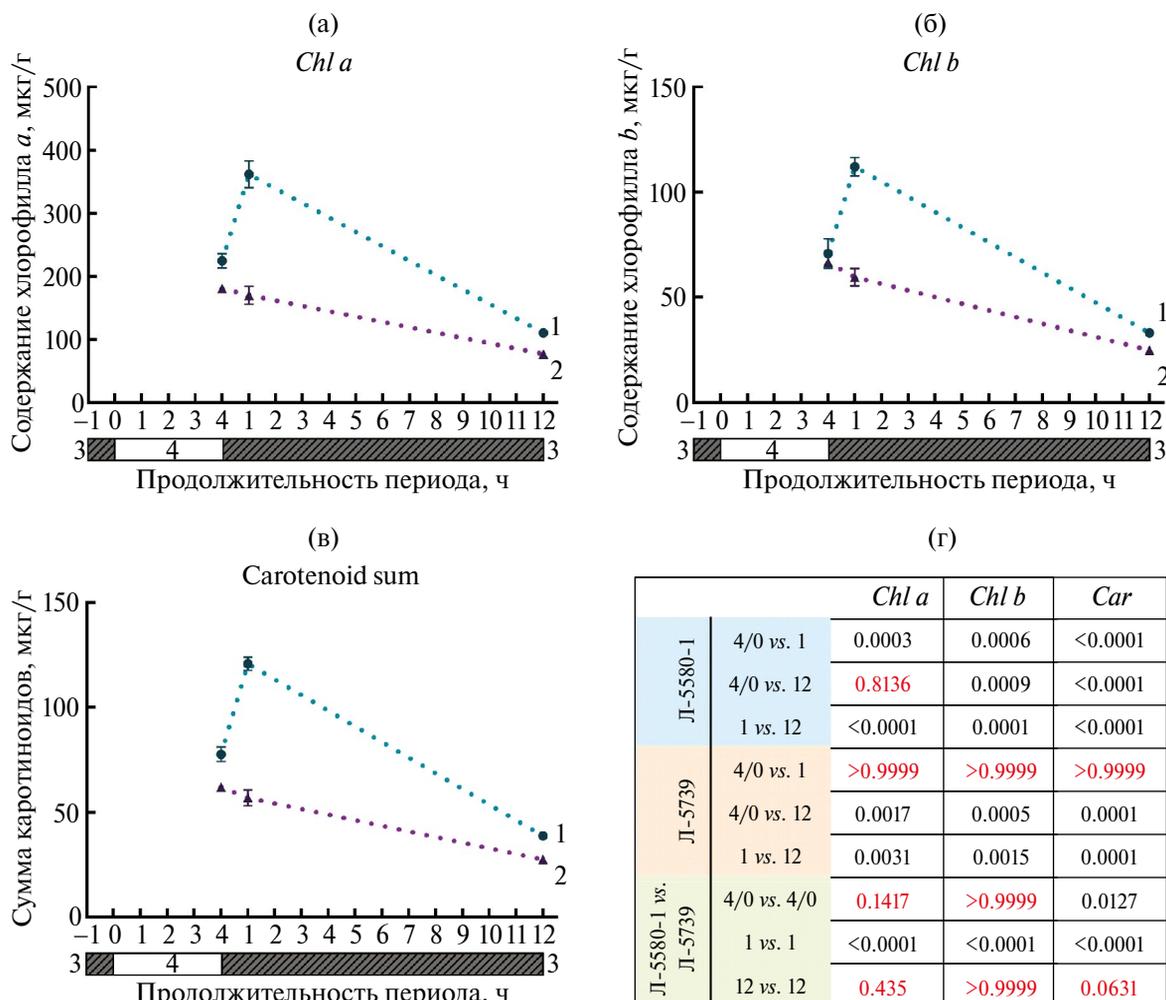


Рис. 4. Содержание хлорофиллов *a* (а) и *b* (б) и суммы каротиноидов (в) в листьях проростков кукурузы (линии 5580-1 и 5739) в ответ на смену 16-часового фотопериода ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью. Значения $P < 0.05$ (г) соответствуют значимым различиям между точками замера (“4/0”, “1”, “12”) у каждой линии, а также в аналогичных точках между линиями. 1 – Л-5580-1, 2 – Л-5739, 3 – ночь, 4 – день.

характеристик исследуемых линий кукурузы, включая время зацветания, они существенно различаются по динамике изменения уровней транскриптов целевых генов и содержания каротиноидов и хлорофиллов в ответ на резкую смену фотопериода.

ОБСУЖДЕНИЕ

Циркадианный осциллятор растений с помощью повторяющейся модели комбинаторной активности основных регуляторов определяет ритм изменений трети транскриптома [2, 19, 20]. Циркадный ритм находится в зависимости от фотопериода и оказывает воздействие на активность генов, участвующих в приеме и передаче световых сигналов, фотосинтезе и фотозащите растения [2, 10, 12–14].

Объектом данного исследования стала кукуруза *Zea mays* ssp. *mays*, широко возделываемая сегодня сельскохозяйственная культура, проис-

хождение которой связано с доместикацией и интрогрессивной гибридизацией двух теосинте – *Z. mays* var. *parviglumis* и var. *mexicana* [21]. Поскольку центром происхождения кукурузы были субтропики (юг современной Мексики), вид изначально принадлежал к растениям короткого дня. Последовавшая искусственная селекция и продвижение культуры в умеренные широты привели к появлению нейтральных по отношению к фотопериоду образцов, которые стали родоначальниками большинства современных сортов, гибридов и инбредных линий *Z. mays* [21, 22]. Таким образом, вид *Z. mays* примечателен тем, что исходно генетически запрограммирован на короткодневность, но приобрел нейтральный статус, и такие преобразования могут быть связаны с изменениями в циркадном осцилляторе и в работе генов, связанных с фотопериодом.

В данной работе в листьях 18–20-дневных проростков кукурузы была охарактеризована дифференциальная (в ответ на смену фотопе-

риода) экспрессия генов *GIGZ1a* и *GIGZ1b*, кодирующих два паралога одного из главных регуляторов эндогенных часов, тесно связанного с фотопериод-зависимой инициацией цветения [2, 3]. Одновременно был проанализирован уровень мРНК генов ключевых белков фотосистем I (*psaA*) и II (*psbA*) [10, 11], а также генов биосинтеза каротиноидов (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*), определяющих главные этапы пути [28, 33, 34]. В тех же тканях было измерено содержание хлорофиллов (*a* и *b*) и суммы каротиноидов.

Суточный ритм профиля экспрессии большинства анализируемых генов в фотосинтезирующей ткани известен. Все они активируются светом. Начиная с рассвета, растет уровень транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b*; к концу дня он достигает максимума, затем в течение ночи снижается до предутреннего минимума [3]. Наибольший уровень транскриптов генов *psaA* и *psbA* характерен для середины дня; к наступлению темноты он идет на спад, а с утра снова начинает расти [37]. Уровень экспрессии *ZmPSY2* также достигает максимума к середине дня и снижается к наступлению ночи, тогда как регуляция экспрессии *ZmPSY1*, предположительно, от света не зависит [28]. Пик активности генов *LCY* и *OR* приходится на первую половину дня; к вечеру уровень мРНК снижается до минимальных значений, а к концу ночи снова начинает расти, что показано на примере генов *LcyB* и *CrOr* зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [38].

Две исследуемые линии кукурузы, Л-5580-1 и Л-5739, характеризовались сходными признаками, включая сроки цветения/спелости (группа ФАО), что предполагало присутствие у обеих линий аналогичных связей фотопериод-циркадный ритм. Измерения были проведены в листьях растений в ответ на смену длинного 16-часового фотопериода на ультракороткий 4-часовой день и 12-часовой ночь/“темный день”, что отличается от использованных в других работах стрессовых условий – постоянного (24-часового) света или темноты [28, 36].

Несмотря на внешнее сходство линий, реакция на смену фотопериода различалась на молекулярном уровне. Так, у обеих линий наблюдался рост экспрессии генов циркадного цикла *GIGZ1a* и *GIGZ1b* спустя 1 ч после перехода в режим “темного дня”. Однако, к концу (12 ч) “темного дня” уровень транскриптов продолжал расти у Л-5580-1 и, напротив, стал снижаться у Л-5739 (рис. 1а, б). Как упоминалось выше, в норме (длинный фотопериод) мРНК *GIGZ1a* и *GIGZ1b* начинает накапливаться с рассвета, достигая к вечеру максимума, затем в течение ночи уровень транскриптов генов снижается до минимума [3]. При отмене ночи (постоянный день или “светлая ночь”) циркадный ритм сохраняется, однако

падение уровня транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* с наступлением “светлой ночи” происходит менее интенсивно, чем реальной темной ночью [3].

Наши данные (рис. 1а, б) свидетельствуют в пользу поддержания циркадного ритма у растений Л-5580-1, в листьях которых пик уровня транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* спустя 12 ч “темного дня” (рис. 1а, б) соответствует вечернему максимуму дневной экспрессии в режиме длинного 16-часового дня. В то же время падение активности *GIGZ1a* и *GIGZ1b* у Л-5739 в этой же точке (рис. 1а, б) ожидаемо, скорее, для второй половины ночи. С одной стороны, одинаковые характеристики линий предполагают компенсацию разной чувствительности к фотопериоду некими другими внутренними факторами. Интереснее, однако, версия, что в сравнении с линией Л-5580-1, сохранившей циркадный ритм, линия Л-5739 либо не может его поддерживать в изменившихся условиях, либо быстрее адаптируется к изменению фотопериода, поскольку сразу восприняла “темный день” как ночь, вследствие чего активность генов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* соответствует ночному уровню. О подобных различиях у двух внешне сходных линий может свидетельствовать также существенно более низкий у Л-5739 исходный (точка “4/0”) уровень транскриптов *GIGZ1a* (рис. 1а), который считается функциональным гомологом гена *A. thaliana GI* [23]. Следовательно, можно предположить, что *GIGZ1a* участвует в определении степени адаптивности или же пластичности циркадного ритма у генотипов кукурузы.

Возможно различия в способности сохранения циркадного ритма и/или в адаптивности у исследуемых линий допускает, что дифференциальная экспрессия генов фотосистем и биосинтеза каротиноидов в ответ на смену фотопериода также индивидуальна.

Действительно, линии значительно различались по исходному (“4/0”) уровню транскриптов *psaA* и *psbA* (рис. 2а, б). Снижение экспрессии генов у обеих линий через 1 ч после наступления “темного дня” (рис. 2а, б) соответствует темновой фазе фотосинтеза и находится в согласии с ранее показанным сокращением уровня транскриптов генов *psaA* и *psbA* к наступлению темноты [37]. Однако далее, к 12 ч “темного дня”, у Л-5580-1 уровень транскриптов *psaA* и *psbA* вырос (рис. 2а, б), как если бы это был день, что подтверждает сохранение циркадного цикла у данной линии. В то же время у Л-5739 активность генов напротив продолжила падать (рис. 2а, б), что соответствует ночному профилю экспрессии генов и, учитывая известную роль *psaA* и *psbA* в адаптации растения к изменениям в характеристиках света [11], может служить подтверждением повышенной адаптивности Л-5739 к смене фотопериода.

Рассматривая в контексте наших предположений профиль экспрессии *ZmPSY1* и *ZmPSY2* нужно учитывать, что с каротиногенезом в листьях связаны оба гена фитоинсинтаз, но свет влияет только на *ZmPSY2*, а активность *ZmPSY1* находится под действием фитохром-независимой регуляции и важна для поддержания синтеза каротиноидов в темноте [28].

Мы обнаружили, что *ZmPSY1* отреагировал на затемнение резким (у обеих линий) ростом активности в точке “1” (что, вероятно, ассоциировано с ролью гена в каротиногенезе в темноте) и ее падением (в разной степени у линий) в точке “12” (рис. 3а). Можно предположить, что последнее может быть связано с сохранением циркадного ритма у Л-5580-1 (резкое падение уровня транскриптов гена к концу 16-часового дня предшествующего режима) и со скорой адаптацией к ночи у Л-5739 (только небольшое снижение экспрессии гена и функционирование в темноте).

Характерно, что уровень экспрессии фитохром-зависимого гена *ZmPSY2* в листьях Л-5580-1 был одинаков во всех точках измерения (рис. 3б), что снова говорит о возможном поддержании циркадного ритма 16-часового дня. В то же время у Л-5739 ген *ZmPSY2* вел себя сходным с *ZmPSY1* образом (рис. 3а). Уровень транскриптов вырос в ответ на смену фотопериода (“1”), что согласуется с индукцией *ZmPSY2* в листьях в ответ на абиотические стрессы [28], и затем упал (“12”), предположительно, в силу привыкания к ночной темноте.

Сходную с *ZmPSY1* модель ответа на стресс показали также гены *ZmLCYE* и *ORANGE-GREEN* (рис. 3в, г), что подкрепляет сделанные нами предположения.

Снижение, согласно результатам биохимического анализа, содержания хлорофиллов и каротиноидов в точке “12” у обеих линий (рис. 4а, б, в), вероятно, соответствует процессам, происходящим в темновой фазе фотосинтеза, когда снижаются фотосинтетические реакции (что определяется как “циркадная ночная депрессия фотосинтеза” (circadian night depression of photosynthesis)) у растений [39]. Хотя первые стадии синтеза хлорофиллов происходят в темноте, восстановление образующихся протохлорофиллидов до хлорофиллидов *a* требует освещения [40]. Поэтому наблюдаемое снижение содержания хлорофиллов в конце 12-часовой ночи (рис. 4а–в) было ожидаемо для обеих линий, независимо от способности поддерживать циркадный ритм в изменившихся условиях.

Интересно, что у Л-5739 резкий рост уровня транскриптов *ZmPSY1* и *ZmPSY2* в точке “1” (рис. 3а, б) не приводит к увеличению содержания каротиноидов (рис. 4в), что говорит в пользу повышенной адаптивности линии и согласуется с обычным ночным снижением суммы кароти-

ноидов в фотосинтезирующей ткани. В то же время у Л-5580-1 подъему экспрессии гена *ZmPSY1* в точке “1” (рис. 3а) сопутствует резкий рост количества пигмента (рис. 4в), то есть, вероятно, сохраняется циркадный ритм, и начало “темного дня” воспринимается как продолжение 16-часового дня предшествующего режима.

В заключение, в данной работе было изучено воздействие смены фотопериода на активность ключевых генов циркадного ритма (*GIGZ1a*, *GIGZ1b*), фотосистем I (*psaA*) и II (*psbA*) и каротиногенеза (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*), а также на содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях двух инбредных линий кукурузы. Выяснилось, что, несмотря на сходство линий по признаку скороспелости (группа ФАО), они существенно различаются по молекулярной реакции на изменение длины дня, что может быть связано с особенностями их родословных. Полученные данные свидетельствуют о потенциале поддержания циркадного ритма у линии Л-5580-1 и о предположительно повышенной адаптивности у Л-5739. Таким образом, фотосинтезирующие ткани проростков кукурузы могут быть использованы для определения доноров признаков, связанных со способностью сохранять циркадный ритм и/или высокой скоростью адаптации в изменившихся условиях фотопериода. Для этого предполагается проведение анализа изменения содержания хлорофиллов/каротиноидов и профиля экспрессии использованных в работе генов в ответ на смену условий фотопериода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-16-00008) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Авторы благодарны С.П. Аппаеву за предоставление семян кукурузы исследуемых линий.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hut R.A., Beersma D.G. Evolution of time-keeping mechanisms: early emergence and adaptation to photoperiod // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2011. V. 366. P. 2141. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0409>
2. Bendix C., Marshall C.M., Harmon F.G. Circadian clock genes universally control key agricultural traits // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 1135. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.003>

3. Miller T.A., Muslin E.H., Dorweiler J.E. A maize *CON-STANS*-like gene, *conz1*, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods // *Planta*. 2008. V. 227. P. 1377.
<https://doi.org/1007/s00425-008-0709-1>
4. Harmer S.L., Hogenesch J.B., Straume M., Chang H.S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., Kay S.A. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock // *Sci*. 2000. V. 290. P. 2110.
<https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2110>
5. Mishra P., Panigrahi K.C. GIGANTEA – an emerging story // *Front. Plant Sci*. 2015. V. 6 P. 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00008>
6. Ronald J., McCarthy K., Davis S.J. GIGANTEA integrates photoperiodic and temperature signals to time when growth occurs // *Mol. Plant*. 2020. V. 13. P. 357.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.008>
7. Ke Q., Kim H.S., Wang Z., Ji C.Y., Jeong J.C., Lee H.S., Choi Y.-I., Xu B., Deng X., Yun D.-J., Kwak S.S. Down regulation of GIGANTEA like genes increases plant growth and salt stress tolerance in poplar // *Plant Biotech. J*. 2017. V. 15. P. 331.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12628>
8. Siemiatkowska B., Chiara M., Badiger B.G., Riboni M., D'Avila F., Braga D., Salem M.A.A., Martignago D., Colanero S., Galbiati M., Giavalisco P., Tonelli C., Juenger T.E., Conti L. GIGANTEA is a negative regulator of abscisic acid transcriptional responses and sensitivity in Arabidopsis // *Plant Cell Physiol*. 2022. V. 63. P. 1285.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcac102>
9. Baek D., Kim W.Y., Cha J.Y., Park H.J., Shin G., Park J., Lim C.J., Chun H.J., Li N., Kim D.H., Lee S.Y., Pardo J.M., Kim M.C., Yun D.J. The GIGANTEA-ENHANCED EM LEVEL complex enhances drought tolerance via regulation of abscisic acid synthesis // *Plant Physiol*. 2020. V. 184. P. 443.
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00779>
10. Alp F.N., Arikan B., Ozfidan-Konakci C., Balci M., Yildiztugay E., Cavusoglu H. Multiwalled carbon nanotubes alter the PSII photochemistry, photosystem-related gene expressions, and chloroplastic antioxidant system in *Zea mays* under copper toxicity // *J. Agric. Food Chem*. 2022. V. 70. P. 11154.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02608>
11. Steiner S., Dietzel L., Schröter Y., Fey V., Wagner R., Pfannschmidt T. The role of phosphorylation in redox regulation of photosynthesis genes *psaA* and *psbA* during photosynthetic acclimation of mustard // *Mol. Plant*. 2009. V. 2. P. 416.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssp007>
12. Li J., Lu Y., Chen H., Wang L., Wang S., Guo X., Cheng X. Effect of photoperiod on vitamin E and carotenoid biosynthesis in mung bean (*Vigna radiata*) sprouts // *Food Chem*. 2021. V. 358: 129915.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129915>
13. Khajepour F., Hosseini S.A., Nasrabadi R.G., Markou G. Effect of light intensity and photoperiod on growth and biochemical composition of a local isolate of *Nostoc calcicola* // *Appl. Biochem. Biotech*. 2015. V. 176. P. 2279.
<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1717-9>
14. Lefsrud M.G., Kopsell D.A., Augé R.M., Both A.J. Biomass production and pigment accumulation in kale grown under increasing photoperiods // *HortSci*. 2006. V. 41. P. 603.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1190945>
15. Simkin A.J., Kapoor L., Doss C.G.P., Hofmann T.A., Lawson T., Ramamoorthy S. The role of photosynthesis related pigments in light harvesting, photoprotection and enhancement of photosynthetic yield in planta // *Photosynth. Res*. 2022. V. 152. P. 23.
<https://doi.org/10.1007/s11120-021-00892-6>
16. Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism // *Annu. Rev. Plant Biol*. 2005. V. 56. P. 165.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
17. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color // *Subcell. Biochem*. 2016. V. 79. P. 35.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
18. Dhar M.K., Mishra S., Bhat A., Chib S., Kaul S. Plant carotenoid cleavage oxygenases: structure-function relationships and role in development and metabolism // *Brief. Funct. Genomics*. 2020. V. 19. P. 1.
<https://doi.org/10.1093/bfpg/elz037>
19. Hayes K.R., Beatty M., Meng X., Simmons C.R., Habben J.E., Danilevskaya O.N. Maize global transcriptomics reveals pervasive leaf diurnal rhythms but rhythms in developing ears are largely limited to the core oscillator // *PLoS One*. 2020. V. 5 P. e12887.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012887>
20. Khan S., Rowe S.C., Harmon F.G. Coordination of the maize transcriptome by a conserved circadian clock // *BMC Plant Biol*. 2010. V. 10: 126.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-126>
21. Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M.M., Sanchez G.J., Buckler E., Doebley J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 6080.
<https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
22. Chen Q., Zhong H., Fan X.W., Li Y.Z. An insight into the sensitivity of maize to photoperiod changes under controlled conditions // *Plant Cell Environ*. 2015. V. 38. P. 1479.
<https://doi.org/10.1111/pce.12361>
23. Bendix C., Mendoza J.M., Stanley D.N., Meeley R., Harmon F.G. The circadian clock-associated gene *gigantea1* affects maize developmental transitions // *Plant Cell Environ*. 2013. V. 36. P. 1379.
<https://doi.org/10.1111/pce.12067>
24. Li Z., Gao F., Liu Y., Abou-Elwafa S.F., Qi J., Pan H., Hu X., Ren Z., Zeng H., Liu Z., Zhang D., Xi Z., Liu T., Chen Y., Su H., Xiong S., Ku L. ZmG12 regulates flowering time through multiple flower development pathways in maize // *Plant Sci*. 2023. V. 332: 111701.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111701>

25. *Cazzonelli C.I., Pogson B.J.* Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. P. 266.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>
26. *Gallagher C.E., Matthews P.D., Li F., Wurtzel E.T.* Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses (Poaceae) // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 1776.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.039818>
27. *Li F., Vallabhaneni R., Wurtzel E.T.* *PSY3*, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root Carotenogenesis // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. P. 1333.
<https://doi.org/10.1104/pp.107.111120>
28. *Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., Wurtzel E.T.* The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance // *Plant Physiol.* 2008. V. 147. P. 1334.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.122119>
29. *Welsch R., Zhou X., Koschmieder J., Schlossarek T., Yuan H., Sun T., Li L.* Characterization of cauliflower OR mutant variants // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 10. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01716>,
30. *Kim S.-E., Lee C.-J., Park S.-U., Lim Y.-H., Park W.S., Kim H.-J., Ahn M.J., Kwak S.S., Kim H.S.* Overexpression of the golden SNP-carrying orange gene enhances carotenoid accumulation and heat stress tolerance in sweetpotato plants // *Antioxidants.* 2021. V. 10: 51.
<https://doi.org/10.3390/antiox10010051>
31. *Yazdani M., Croen M.G., Fish T.L., Thannhauser T.W., Ahner B.A.* Overexpression of native *ORANGE (OR)* and OR mutant protein in *Chlamydomonas reinhardtii* enhances carotenoid and ABA accumulation and increases resistance to abiotic stress // *Metab. Eng.* 2021. V. 68. P. 94.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.09.006>
32. *Lopez A.B., Van Eck J., Conlin B.J., Paolillo D.J., O'Neill J., Li L.* Effect of the cauliflower *Or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 213.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm299>
33. *Berman J., Zorrilla-López U., Medina V., Farré G., Sandmann G., Capell T., Christou P., Zhu C.* The *Arabidopsis ORANGE (AtOR)* gene promotes carotenoid accumulation in transgenic corn hybrids derived from parental lines with limited carotenoid pools // *Plant Cell Rep.* 2017. V. 36. P. 933.
<https://doi.org/10.1007/s00299-017-2126-z>
34. *Zunjare R.U., Hossain F., Muthusamy V., Baveja A., Chauhan H.S., Bhat J.S., Thirunavukkarasu N., Saha S., Gupta H.S.* Development of biofortified maize hybrids through marker-assisted stacking of *β-Carotene Hydroxylase*, *Lycopene-ε-Cyclase* and *Opaque2* genes // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9: 178.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00178>
35. *Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z.* Differential regulation of phytoene synthase *PSY1* during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants.* 2020. V. 9: 1169.
<https://doi.org/10.3390/plants9091169>
36. *Li J., Lu Y., Chen H., Wang L., Wang S., Guo X., Cheng X.* Effect of photoperiod on vitamin E and carotenoid biosynthesis in mung bean (*Vigna radiata*) sprouts // *Food Chem.* 2021. V. 358: 129915.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129915>
37. *Kayanja G.E., Ibrahim I.M., Puthiyaveetil S.* Regulation of *Phaeodactylum* plastid gene transcription by redox, light, and circadian signals // *Photosynth. Res.* 2021. V. 147. P. 317.
<https://doi.org/10.1007/s11120-020-00811-1>
38. *Sun T.H., Liu C.Q., Hui Y.Y., Wu W.K., Zhou Z.G., Lu S.* Coordinated regulation of gene expression for carotenoid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. P. 868.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00993.x>
39. *Pupillo P., Sparla F., Melandri B.A., Trost P.* The circadian night depression of photosynthesis analyzed in a herb, *Pulmonaria vallisarsae*. Day/night quantitative relationships // *Photosynth. Res.* 2022. V. 154. P. 143.
<https://doi.org/10.1007/s11120-022-00956-1>
40. *Vedalankar P., Tripathy B.C.* Evolution of light-independent protochlorophyllide oxidoreductase // *Protoplasma.* 2019. V. 256. P. 293.
<https://doi.org/10.1007/s00709-018-1317-y>

УДК 581.1

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ И ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА НАЧАЛЬНЫЙ РОСТ РАСТЕНИЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2024 г. Н. Е. Манжелесова^а, Р. П. Литвиновская^{а, *}, А. Л. Савчук^а,
Д. В. Денисюк^а, В. А. Хрипач^а

^аГосударственное научное учреждение “Институт биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси”, Минск, Беларусь

*e-mail: litvin@iboch.by

Поступила в редакцию 26.01.2024 г.

После доработки 27.02.2024 г.

Принята к публикации 27.02.2024 г.

Исследовали росторегулирующее действие 24-эпибрассинолида, 24-эпикастастерона и феруловой кислоты на начальных этапах онтогенеза растений яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при раздельном и совместном применении, их влияние на эндогенный баланс фитогормональных стероидов и динамику некоторых физиологических процессов. Соединения и их смеси применяли путем замачивания семян в растворах веществ на 24 ч. Используемые для исследования концентрации brassinosteroidов (10^{-7} и 10^{-9} М) были выбраны в ходе предшествующих экспериментов, поскольку показали стимулирующий эффект на ростовые процессы. Феруловую кислоту в смесях и отдельно применяли в эквимолярных дозировках. Растения выращивали в течение 3 недель в почвенной культуре. Пробы (листья) для анализов брали на 7, 14 и 21 сутки от начала обработки семян растворами веществ. Показано, что предпосевная обработка семян brassinosteroidами или феруловой кислотой приводила к активации ростовых функций, увеличению в листьях уровня эндогенных brassinosteroidов, свободно-радикального окисления и пигментов. При совместном применении brassinosteroidов и феруловой кислоты эффективность их действия увеличивалась. Изучение дифференцированного и совместного действия фитогормональных стероидов и феруловой кислоты показало, что эти соединения проявляют в большей или меньшей степени синергическое взаимодействие при стимуляции ростовых и метаболических процессов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, 24-эпибрассинолид, 24-эпикастастерон, brassinosteroidы, малоновый диальдегид, рост, феруловая кислота, фотосинтетические пигменты

DOI: 10.31857/S0015330324030038, EDN: NMYUDA

ВВЕДЕНИЕ

Браassinosteroidы (БС) – класс полиоксигенированных стероидных гормонов, широко распространенных в растительном мире и обладающих ярко выраженной росторегулирующей активностью, в том числе в специфических биотестах. Это позволило, во-первых, разграничить их с другими эндогенными фитогормонами, во-вторых, доказать, что БС обладают фитогормональными свойствами и могут быть обозначены как отдельная группа растительных гормонов [1]. Большое количество экспериментальных данных доказывает наличие взаимодействия БС и практически всех “классических” фитогормонов, включая влияние фитогормо-

нальных стероидов на активацию и метаболизм других гормонов и участие наряду с последними в интеграции различных сигналов, перестройке в росте и стресс-адаптации [2]. Установленное синергическое взаимодействие БС с ауксинами при стимуляции ростовых процессов стало основой создания новых соединений – конъюгатов БС и ИУК, показавших высокую росторегулирующую активность [3]. Взаимодействие БС и негормональных регуляторов, таких как фенольные соединения, до сих пор не изучалось, тогда как существование взаимосвязи между ними представляется возможным. В литературе имеются сведения о влиянии фитогормональных стероидов на содержание фенольных соединений в растительных тканях [4]. Вероятно, БС могут как активировать, так и ингибировать работу отдельных элементов транскрипционно-

Сокращения: БС – brassinosteroidы; ФК – феруловая кислота; ЭК – 24-эпикастастерон; ЭБ – 24-эпибрассинолид.

го комплекса, определяющего временную и пространственную экспрессию генов биосинтеза фенолов [5]. В промоторах генов этих факторов транскрипции найдены чувствительные к гормонам элементы [6]. Просматривается определенная связь между содержанием БС и фенольными соединениями в онтогенезе растений. Так, максимальное количество БС наблюдали в покоящихся семенах и проростках, их содержание резко снижалось в фазе интенсивного роста растений и снова возрастало к фазе полной зрелости семян [7]. Накопление фенольных соединений носит иной характер, минимальное их количество содержится в покоящихся семенах и постепенно увеличивается, достигая максимума в фазе цветения [8, с. 80; 9]. Таким образом, эти две группы регуляторов роста будто бы дополняют друг друга. В то же время фенольные соединения имеют много общего с brassinosterоидами. Функциональная роль фенольных соединений также связана с ростом растений, фотосинтезом, дыханием, защитой клеток и тканей от стрессовых воздействий. Представители этой группы веществ обладают антиоксидантной активностью, мембраностабилизирующей способностью, влияют на структуру белков, являются пигментами и копигментами, субстратами дыхания, предшественниками для синтеза убихинонов, пластохинонов [10, 11]. Вместе с тем среди большого разнообразия фенольных соединений выявлено очень немного типичных регуляторов роста. Показано, что росторегулирующая способность фенолов неодинаковая и возрастает в ряду флавоны – изофлавоны – флавонолы – оксибензойные кислоты – оксикоричные кислоты – оксикумарины [8, с. 54]. Феруловая кислота (ФК), входящая в группу оксикоричных кислот, содержится практически во всех растениях, а в злаках – преимущественно. В зерне пшеницы ее количество составляет 0.8–2.0 г/кг сухого веса и может составлять до 90% от общего содержания полифенолов [12]. ФК используется в качестве действующего вещества лекарственных препаратов и в косметической промышленности как активный антиоксидант. Применение ФК на растениях продемонстрировало, что соединение выступает как регулятор физиологических процессов, связанных с ростом и стрессоустойчивостью, таких как клеточное деление, проницаемость мембран, фотосинтез, дыхание и др. [13, 14]. В настоящем исследовании использовали экзогенное применение композиций, состоящих из БС (24-эпибрассинолид или 24-эпикастастерон) и негормонального фиторегулятора – ФК, полагая, что добавление ФК повысит росторегулирующую функцию БС и будет способствовать восполнению или повышению их эндогенного уровня.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на растениях яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Дарья белорусской селекции. Соединения (БС, ФК) и их смеси применяли путем предпосевной обработки семян. Семена погружали в растворы веществ на 24 ч, затем подсушивали и высевали в пластиковые сосуды с почвой объемом 0.8 л, по 25 семян в сосуд. Почва дерново-подзолистая, суглинок. Растения пшеницы выращивали в течение 14 суток при температуре 22°/20°С (день/ночь) и 16-часовом фотопериоде (светодиодный светильник ДБП-03-14-820 (ЧТУП “Блок Модуль”, Беларусь) мощностью 14 Вт), влажность почвы поддерживалась на уровне 70% от полной влагоемкости.

Синтез БС (24-эпибрассинолид, 24-эпикастастерон) осуществлен в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси. БС использовали в концентрациях 10^{-7} и 10^{-9} М, которые, согласно нашим предыдущим исследованиям, являются оптимальными для стимуляции роста растений. ФК в смесях и отдельно применяли в эквимолярных концентрациях.

Пробы (листья) для анализов брали на 7, 14 и 21 сутки от начала обработки семян растворами БС и ФК.

Влияние БС и ФК на ростовые процессы оценивали по изменению длины и массы надземной части проростков пшеницы.

Для оценки содержания фотосинтетических пигментов свежий измельченный растительный материал (0.1 г) заливали чистым ацетоном в емкостях с притертыми крышками, помещали в темное место и по истечении 48 ч экспозиции подвергали спектрофотометрическому измерению [15]. Оптическую плотность экстракта измеряли на спектрофотометре “NanoDrop 2000” (Thermo Fisher Scientific, США) со специализированным программным обеспечением с подключением к ПК.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по образованию малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой [16]. Навеску свежей массы (0.5 г) растирали до гомогената в ступке с 1 мл реакционной среды, состоящей из 0.25% раствора тиобарбитуровой кислоты в 10% растворе ТХУ. Гомогенат переносили в пробирки, обмывая ступку небольшими порциями реакционной среды. Конечный объем составлял 4 мл. Гомогенат хорошо перемешивали, пробирки плотно закрывали и помещали в нагретую до 95°–100°С водяную баню на 30 мин. Затем пробирки охлаждали, содержимое центрифугировали 15 мин при 8000 г. Оптическую плотность супернатанта измеряли при длине волны 532 нм. Количество МДА рассчитывали, используя молярный коэффициент экстинкции – $1.55 \times 10^5 / (\text{М см})$.

Для количественной оценки эндогенного содержания БС методом ИФА надземную часть растений фиксировали при температуре -70°C и лиофильно высушивали. Лиофилизацию растительных образцов из замороженного состояния проводили под вакуумом на приборе VirTis 6211 (LabX, США). Лиофилизированные образцы гомогенизировали в 0.05 М Трис(гидроксиметил)аминометане (рН 7.4) с помощью диспергатора IKA T 18 digital ULTRA-TURRAX® (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия). Для более глубокой экстракции гомогенаты выдерживали в течение 24 ч при температуре -20°C , затем образцы центрифугировали на приборе Eppendorf® MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия) и полученный супернатант анализировали. Количественную оценку проводили методом двухстадийного ИФА с использованием разработанных нами ранее иммуоферментных тест-систем для следующих групп наиболее распространенных и активных БС: 24-эпи-, 24S-метил-, 28-гомобраassinостероидов [17, 18]. В полистирольные лунки планшета с иммобилизованными антителами вносили по 150 мкл калибровочных проб и анализируемых образцов в дубликатах. Концентрация стероида в калибровочных пробах составляла 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 и 5 нмоль/л. Планшет инкубировали при 37°C в течение 2 ч, после чего содержимое лунок удаляли и промывали их промывочным раствором (4×150 мкл). Затем во все промытые лунки добавляли по 150 мкл раствора конъюгата соответствующего БС с ПХ и инкубировали 5 мин при 37°C . Затем удаляли содержимое, промывали, как описано выше, добавляли по 150 мкл хромоген-субстратной смеси и инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Останавливали реакцию добавлением во все лунки по 50 мкл раствора стоп-реагента (5% H_2SO_4). Оптическую плотность раствора во всех лунках измеряли на фотометре универсальном Ф300ТП (РУПП “Витязь”, Беларусь) при длине волны 450 нм. Для каждой калибровочной пробы рассчитывали средние арифметические значения оптической плотности, строили график зависимости показателя $B/B_0 \times 100\%$ от концентрации БС в калибровочных пробах (нмоль/л), где B и B_0 – значения оптической плотности продукта ферментативной реакции в присутствии свободного БС и в его отсутствие соответственно. Методом интерполяции по калибровочному графику рассчитывали концентрацию БС (нмоль/л) в анализируемой пробе. Сигмоидальные калибровочные кривые линеаризовали с помощью преобразования *log-logit*: $\text{logit } B/B_0 = \ln((B/B_0)/(100 - B/B_0))$. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel 2010.

Эксперименты повторяли независимо трижды при 3-кратной повторности в каждой серии.

Представлены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность различий рассчитывали по *t*-критерию Стьюдента. Обсуждаются различия, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние браassinостероидов и феруловой кислоты на рост проростков

Предпосевная обработка индивидуальными стероидными фитогормонами и их смесями с ФК повышала всхожесть семян яровой пшеницы. Под влиянием БС, ФК и их смесей активировался также рост проростков и накопление ими биомассы (рис. 1, 2). ФК оказывала заметное стимулирующее действие на растяжение растений, не уступающее по эффективности действию фитогормональных стероидов и усиливающееся в их присутствии. При отдельном использовании соединений стимуляция роста растений составляла в среднем 10%, тогда как при совместном их применении она превышала суммарную активность фитогормональных стероидов и ФК. Следует отметить, что на первых этапах развития растений индивидуальные соединения в равной степени стимулировали как рост растений, так и накопление сырой биомассы. Смеси вели себя несколько иначе. На стадии всходов (7 суток от начала воздействия) растяжение в длину растений стимулировалось практически в два раза интенсивнее, чем накопление биомассы. На 14 сутки от начала воздействия под влиянием смесей начиналось более активное накопление биомассы. Наиболее высокую активность проявила смесь ЭБ и ФК в концентрации 10^{-7} М. Под ее воздействием рост и накопление биомассы растениями стимулировались на 17 и 20% соответственно. К концу опыта проявилась тенденция более сильного положительного влияния фиторегуляторов и их смесей на накопление биомассы и, соответственно, менее активного влияния на рост растений. Сырой вес под влиянием БС и особенно их смесей с ФК повышался к концу эксперимента довольно значительно (в среднем на 15 и 30% соответственно) (рис. 2). Выделялась смесь ЭК и ФК, под воздействием которой накопление биомассы стимулировалось на 60%. Действие ФК оказалось краткосрочным, к концу эксперимента ростовые показатели были на уровне контроля.

Влияние браassinостероидов и феруловой кислоты на эндогенное содержание фитогормональных стероидов

Представленные в табл. 1 результаты показывают, что при предпосевном замачивании семян пшеницы в растворах БС ряда ЭБ и/или ФК происходило значительное повышение эндогенного уровня 24-эпиБС по сравнению с контрольным

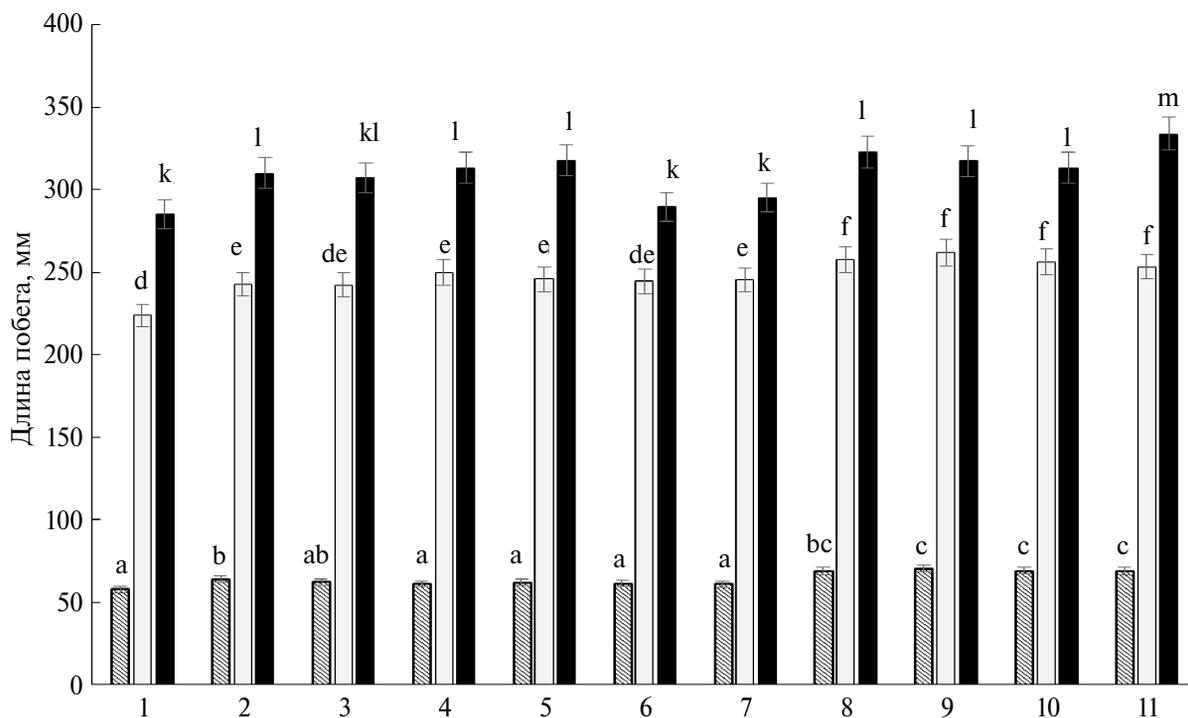


Рис. 1. Влияние 24-эпибрасинолида (ЭБ), 24-эпикастастерона (ЭК), феруловой кислоты (ФК) и их смесей на рост растений яровой пшеницы на 7 (столбики со штриховкой), 14 (светлые столбики) и 21 (черные столбики) сутки от начала обработки семян растворами веществ. 1 – контроль (вода); 2 – ЭБ, 10⁻⁹ М; 3 – ЭБ, 10⁻⁷ М; 4 – ЭК, 10⁻⁹ М; 5 – ЭК, 10⁻⁷ М; 6 – ФК, 10⁻⁹ М; 7 – ФК, 10⁻⁷ М; 8 – ЭБ+ФК, 10⁻⁹ М; 9 – ЭБ+ФК, 10⁻⁷ М; 10 – ЭК+ФК, 10⁻⁹ М; 11 – ЭК+ФК, 10⁻⁷ М. Достоверные различия на уровне $P \leq 0.05$ отмечены разными буквами.

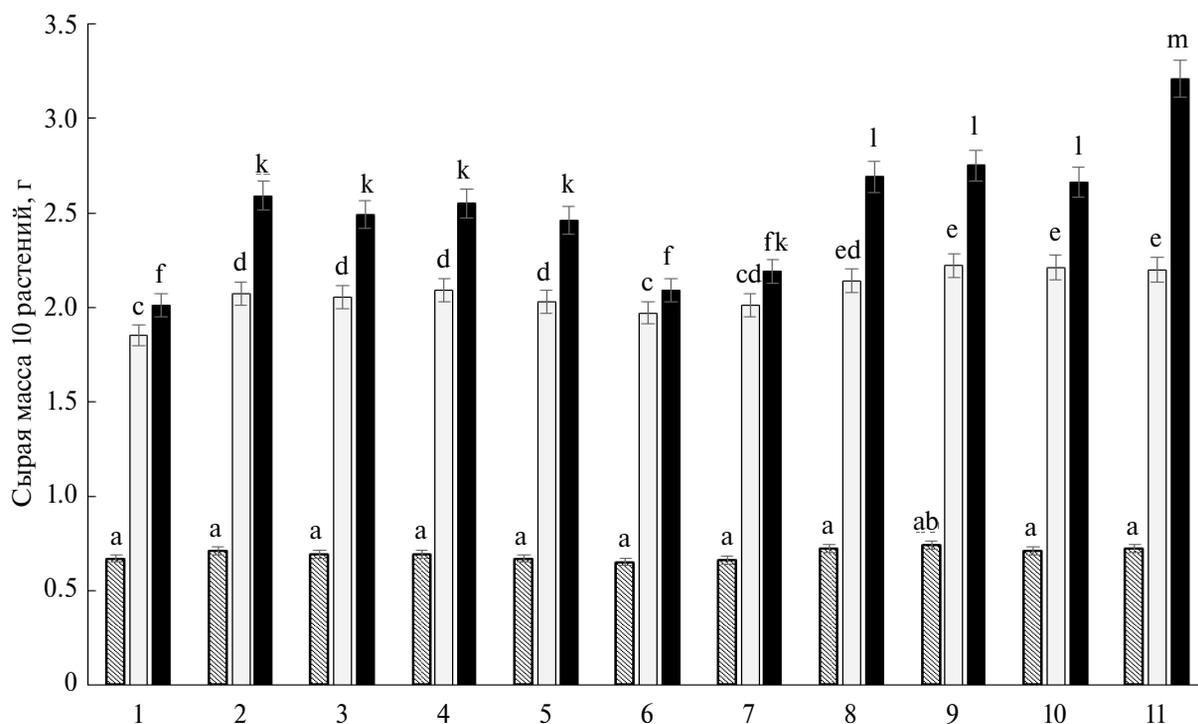


Рис. 2. Влияние 24-эпибрасинолида (ЭБ), 24-эпикастастерона (ЭК), феруловой кислоты (ФК) и их смесей на накопление сырой биомассы растениями яровой пшеницы. Снятие показателей проводили на 7 (столбики со штриховкой), 14 (светлые столбики) и 21 (черные столбики) сутки от начала обработки семян растворами веществ. 1 – контроль (вода); 2 – ЭБ, 10⁻⁹ М; 3 – ЭБ, 10⁻⁷ М; 4 – ЭК, 10⁻⁹ М; 5 – ЭК, 10⁻⁷ М; 6 – ФК, 10⁻⁹ М; 7 – ФК, 10⁻⁷ М; 8 – ЭБ+ФК, 10⁻⁹ М; 9 – ЭБ+ФК, 10⁻⁷ М; 10 – ЭК+ФК, 10⁻⁹ М; 11 – ЭК+ФК, 10⁻⁷ М. Достоверные различия на уровне $P \leq 0.05$ отмечены разными буквами.

Таблица 1. Влияние 24-эпибрассинолида (ЭБ), 24-эпикастерона (ЭК), феруловой кислоты (ФК) и их эквимоларных смесей в концентрации 10^{-9} М и 10^{-7} М на содержание 24R-метилбрасиностероидов в растениях яровой пшеницы на 7, 14 и 21 сутки от начала обработки семян растворами веществ

Растворы веществ, используемые для обработки семян	Содержание 24R-метилбрасиностероидов, нг/г сухой массы		
	7 сут.	14 сут.	21 сут.
Контроль (вода)	3.15 ± 0.258^f	3.08 ± 0.210^d	2.86 ± 0.259^b
24-ЭБ, 10^{-9} М	13.30 ± 1.45^b	11.0 ± 1.56^b	4.53 ± 0.085^a
24-ЭБ, 10^{-7} М	5.80 ± 0.684^d	14.3 ± 0.495^a	2.71 ± 0.155^b
24-ЭК, 10^{-9} М	20.3 ± 0.962^a	11.5 ± 1.49^b	1.66 ± 0.083^c
24-ЭК, 10^{-7} М	7.99 ± 0.800^d	14.3 ± 0.843^a	4.96 ± 0.334^a
ФК, 10^{-9} М	6.02 ± 0.761^d	9.82 ± 0.490^b	2.49 ± 0.050^b
ФК, 10^{-7} М	9.62 ± 0.500^c	8.37 ± 0.145^c	2.31 ± 0.093^b
24-ЭБ+ФК, 10^{-9} М	14.20 ± 2.15^b	15.8 ± 2.45^a	2.03 ± 0.113^b
24-ЭБ+ФК, 10^{-7} М	4.61 ± 0.215^c	15.7 ± 2.00^a	2.29 ± 0.233^b
24-ЭК+ФК, 10^{-9} М	10.90 ± 0.418^c	14.4 ± 1.60^a	2.24 ± 0.028^b
24-ЭК+ФК, 10^{-7} М	11.50 ± 1.04^c	16.8 ± 1.24^a	4.00 ± 0.484^a

Примечание. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

образцом на 7 и 14 сутки от начала воздействия. К концу эксперимента содержание данной группы БС в большинстве вариантов оказалось ниже значения в контрольном образце, в отдельных случаях оставаясь на уровне контроля или незначительно его превышая.

Предпосевное замачивание семян в растворах БС или ФК либо не приводило к изменениям, либо несколько увеличивало эндогенное содержание 24S-метилБС на 7 сутки от начала воздействия (табл. 2). Однако при совместном воздействии БС и ФК наблюдалось повышение содержания данной группы в 4–14 раз. На 14 сутки содержание 24S-метилБС в большинстве вариантов обработки либо было на уровне контроля, либо снижалось (кроме вариантов с применением смесей ЭБ и ФК в концентрации 10^{-9} М и индивидуальных ЭК и ФК в концентрации 10^{-7} М). К концу эксперимента все значения не превышали содержания БС в контрольном образце.

В динамике эндогенного уровня 28-гомоБС наблюдалась схожая с 24S-метилБС тенденция (табл. 3). На начальном этапе роста значительное повышение 28-гомоБС показано при совместной обработке БС+ФК, а также при замачивании в растворах ЭК. На 14 сутки от начала

воздействия наблюдались незначительные колебания на уровне контрольного значения. Только обработка ФК и ФК+ЭК приводила к повышению содержания 28-гомоБС в 2 и 2.4 раза соответственно. К концу эксперимента уровень БС данного ряда во всех вариантах превышал контрольное значение в 1.2–1.9 раз.

Таким образом, при предварительном замачивании семян пшеницы в растворах БС и/или ФК, как правило, происходит значительное повышение эндогенных БС на начальном этапе роста, а на последующих стадиях эндогенный уровень БС устанавливается на уровне контрольных значений.

Влияние брасиностероидов и феруловой кислоты на интенсивность перекисного окисления липидов

Обработка семян фиторегуляторами заметно повышала уровень продукта ПОЛ – МДА в проростках уже на 7 сутки от начала воздействия. Под воздействием ФК содержание МДА увеличивалось на 56%, независимо от концентрации ФК (рис. 3). БС в низкой дозе практически не оказывали влияния на содержание МДА, в высокой – стимулировали его накопление в среднем на 17%. Смеси занимали промежуточное положение. Далее процесс стабилизировался

Таблица 2. Влияние 24-эпибрассинолида (ЭБ), 24-эпикастерона (ЭК), феруловой кислоты (ФК) и их эквимоларных смесей в концентрации 10^{-9} М и 10^{-7} М на содержание 24S-метилбрассиностероидов в растениях яровой пшеницы на 7, 14 и 21 сутки от начала обработки семян растворами веществ

Растворы веществ, используемые для обработки семян	Содержание 24S-метилбрассиностероидов, нг/г сухой массы		
	7 сут.	14 сут.	21 сут.
Контроль (вода)	0.757 ± 0.093 ^d	1.51 ± 0.011 ^b	2.10 ± 0.267 ^a
24-ЭБ, 10^{-9} М	0.662 ± 0.033 ^d	0.982 ± 0.103 ^d	1.76 ± 0.107 ^b
24-ЭБ, 10^{-7} М	1.27 ± 0.209 ^c	1.53 ± 0.164 ^b	1.73 ± 0.186 ^b
24-ЭК, 10^{-9} М	1.17 ± 0.131 ^c	1.10 ± 0.233 ^{cd}	0.697 ± 0.036 ^d
24-ЭК, 10^{-7} М	0.909 ± 0.100 ^d	1.25 ± 0.166 ^c	1.05 ± 0.070 ^c
ФК, 10^{-9} М	1.10 ± 0.074 ^c	0.859 ± 0.024 ^d	2.14 ± 0.149 ^a
ФК, 10^{-7} М	0.890 ± 0.054 ^d	0.842 ± 0.038 ^d	1.02 ± 0.032 ^c
24-ЭБ+ФК, 10^{-9} М	11.1 ± 1.93 ^a	1.94 ± 0.362 ^b	0.918 ± 0.073 ^c
24-ЭБ+ФК, 10^{-7} М	3.51 ± 0.195 ^b	1.29 ± 0.050 ^c	1.18 ± 0.238 ^c
24-ЭК+ФК, 10^{-9} М	3.47 ± 0.416 ^b	1.23 ± 0.086 ^c	0.972 ± 0.011 ^c
24-ЭК+ФК, 10^{-7} М	3.02 ± 0.426 ^b	3.21 ± 0.085 ^a	2.17 ± 0.345 ^a

Примечание. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

Таблица 3. Влияние 24-эпибрассинолида (ЭБ), 24-эпикастерона (ЭК), феруловой кислоты (ФК) и их эквимоларных смесей в концентрации 10^{-9} М и 10^{-7} М на содержание 28-гомобрассиностероидов в растениях яровой пшеницы на 7, 14 и 21 сутки от начала обработки семян растворами веществ

Растворы веществ, используемые для обработки семян	Содержание 28-гомобрассиностероидов, нг/г сухой массы		
	7 сут.	14 сут.	21 сут.
Контроль (вода)	1.20 ± 0.134 ^c	1.44 ± 0.130 ^{cd}	1.68 ± 0.096 ^d
24-ЭБ, 10^{-9} М	0.596 ± 0.027 ^g	1.83 ± 0.097 ^b	2.19 ± 0.154 ^{bc}
24-ЭБ, 10^{-7} М	0.239 ± 0.020 ^h	1.53 ± 0.111 ^c	3.22 ± 0.258 ^a
24-ЭК, 10^{-9} М	1.88 ± 0.125 ^d	1.33 ± 0.151 ^{cd}	2.17 ± 0.202 ^{bc}
24-ЭК, 10^{-7} М	2.86 ± 0.315 ^c	1.23 ± 0.184 ^d	2.28 ± 0.250 ^b
ФК, 10^{-9} М	0.568 ± 0.040 ^g	1.66 ± 0.110 ^c	2.30 ± 0.254 ^b
ФК, 10^{-7} М	0.747 ± 0.037 ^f	2.61 ± 0.241 ^a	2.13 ± 0.065 ^{bc}
24-ЭБ+ФК, 10^{-9} М	15.4 ± 1.56 ^a	1.96 ± 0.150 ^b	2.87 ± 0.052 ^a
24-ЭБ+ФК, 10^{-7} М	9.49 ± 1.01 ^b	1.45 ± 0.249 ^{cd}	2.48 ± 0.112 ^b
24-ЭК+ФК, 10^{-9} М	3.03 ± 0.341 ^c	1.25 ± 0.181 ^d	1.99 ± 0.119 ^c
24-ЭК+ФК, 10^{-7} М	1.79 ± 0.159 ^d	3.41 ± 0.558 ^a	2.83 ± 0.394 ^a

Примечание. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

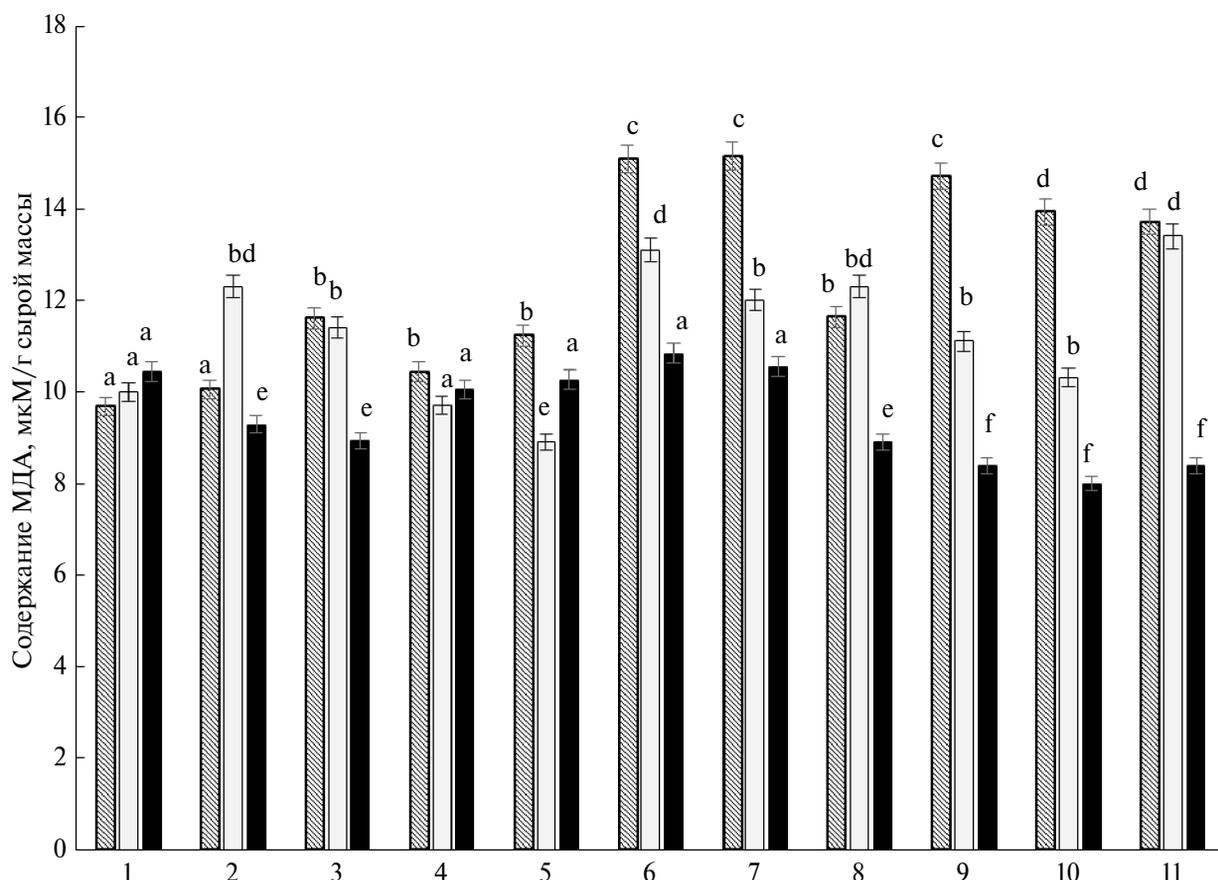


Рис. 3. Влияние 24-эпibrассинолида (ЭБ), 24-эпикастестерона (ЭК), феруловой кислоты (ФК) и их смесей на содержание малонового диальдегида в растениях яровой пшеницы на 7 (столбики со штриховкой), 14 (светлые столбики) и 21 (черные столбики) сутки от начала обработки семян растворами веществ. 1 – контроль (вода); 2 – ЭБ, 10⁻⁹ М; 3 – ЭБ, 10⁻⁷ М; 4 – ЭК, 10⁻⁹ М; 5 – ЭК, 10⁻⁷ М; 6 – ФК, 10⁻⁹ М; 7 – ФК, 10⁻⁷ М; 8 – ЭБ+ФК, 10⁻⁹ М; 9 – ЭБ+ФК, 10⁻⁷ М; 10 – ЭК+ФК, 10⁻⁹ М; 11 – ЭК+ФК, 10⁻⁷ М. Достоверные различия на уровне $P < 0.05$ отмечены разными буквами.

и к концу эксперимента содержание МДА в растениях во всех вариантах, кроме ФК, было снижено по отношению к контролю, в наибольшей степени при применении смесей.

Влияние brassinosterоидов и феруловой кислоты на содержание фотосинтетических пигментов

Под влиянием БС и ФК изменялось содержание пигментов в растениях в онтогенезе. Индивидуальные вещества и их смеси на 7 и 14 сутки воздействия оказывали стимулирующее влияние на формирование пигментного аппарата, что проявлялось в увеличении содержания хлорофилла, особенно на 14 сутки (рис. 4). Среди индивидуальных соединений наибольшую активность проявила ФК. Под ее воздействием содержание зеленых пигментов возрастало на 80%, БС увеличивали этот показатель в среднем на 25-30%. При этом если изученные концентрации ФК не сказывались на эффективности ее действия, то БС стимулировали накопление пигментов в большей степени при применении их в концентрации 10⁻⁹ М. Добавление ФК

к ЭБ увеличивало содержание зеленых пигментов в проростках почти вдвое. Смеси ЭК и ФК увеличивали содержание хлорофилла в 2.4 раза. К концу эксперимента количество хлорофилла в листьях в вариантах с применением смесей оставалось на уровне контроля, тогда как под влиянием индивидуальных веществ содержание зеленых пигментов оставалось выше контрольного, в основном за счет хлорофилла *a*. Только под влиянием ФК увеличивалась концентрация обоих форм пигмента – *a* и *b*. Соотношение хлорофилла *a/b* во всех вариантах существенно не менялось. Обращает на себя внимание тот факт, что под влиянием смесей содержание каротиноидов в проростках было повышенным в течение всего эксперимента, тогда как индивидуальные соединения вначале ингибировали их накопление, в дальнейшем БС практически не оказывали влияния на этот показатель, а ФК повышала их уровень (рис. 5). Смеси способствовали накоплению каротиноидов в наибольшей степени, особенно при использовании составляющих их компонентов в высокой концентрации.

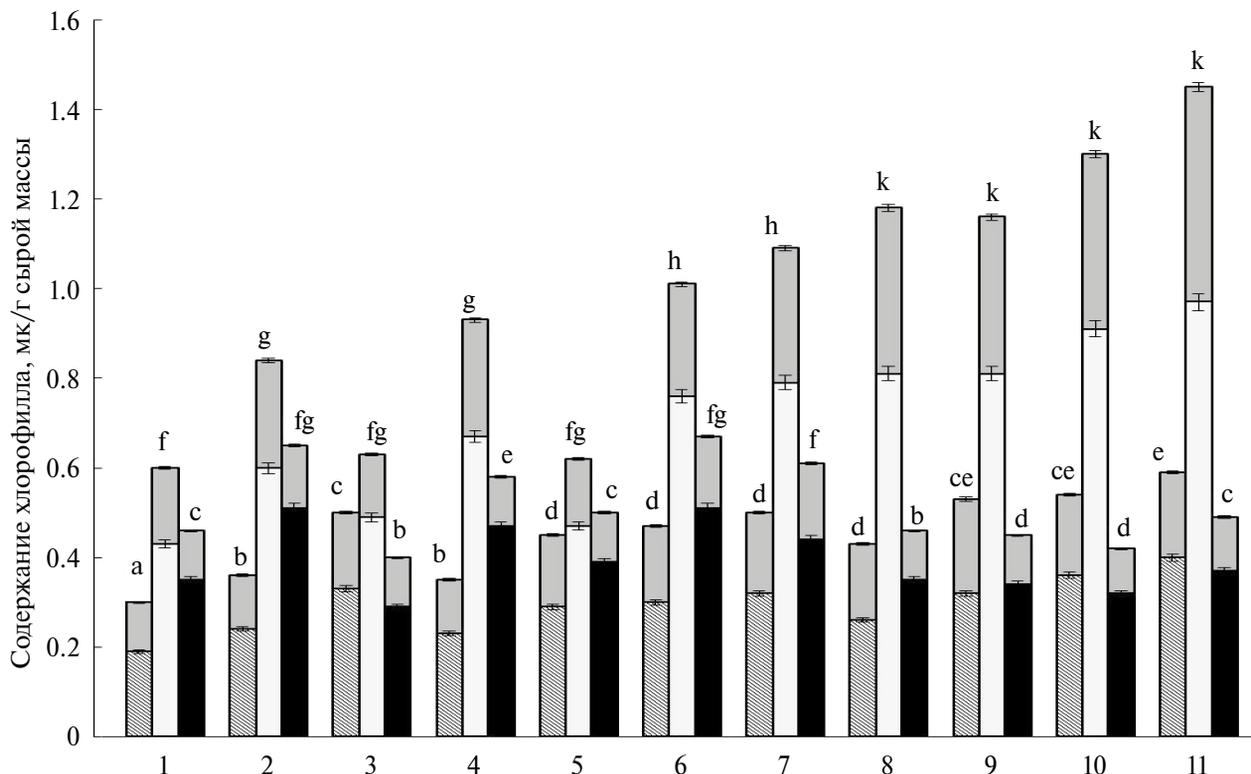


Рис. 4. Влияние 24-эпибрасинолида (ЭБ), 24-эпикаастерона (ЭК), феруловой кислоты (ФК) и их смесей на содержание хлорофилла в растениях яровой пшеницы на 7 (столбики со штриховкой), 14 (светлые столбики) и 21 (черные столбики) сутки от начала обработки семян растворами веществ. 1 – контроль (вода); 2 – ЭБ, 10^{-9} М; 3 – ЭБ, 10^{-7} М; 4 – ЭК, 10^{-9} М; 5 – ЭК, 10^{-7} М; 6 – ФК, 10^{-9} М; 7 – ФК, 10^{-7} М; 8 – ЭБ+ФК, 10^{-9} М; 9 – ЭБ+ФК, 10^{-7} М; 10 – ЭК+ФК, 10^{-9} М; 11 – ЭК+ФК, 10^{-7} М. Нижние столбики – хлорофилл *a*, верхние темно-серые столбики – хлорофилл *b*. Достоверные различия на уровне $P \leq 0.05$ отмечены разными буквами.

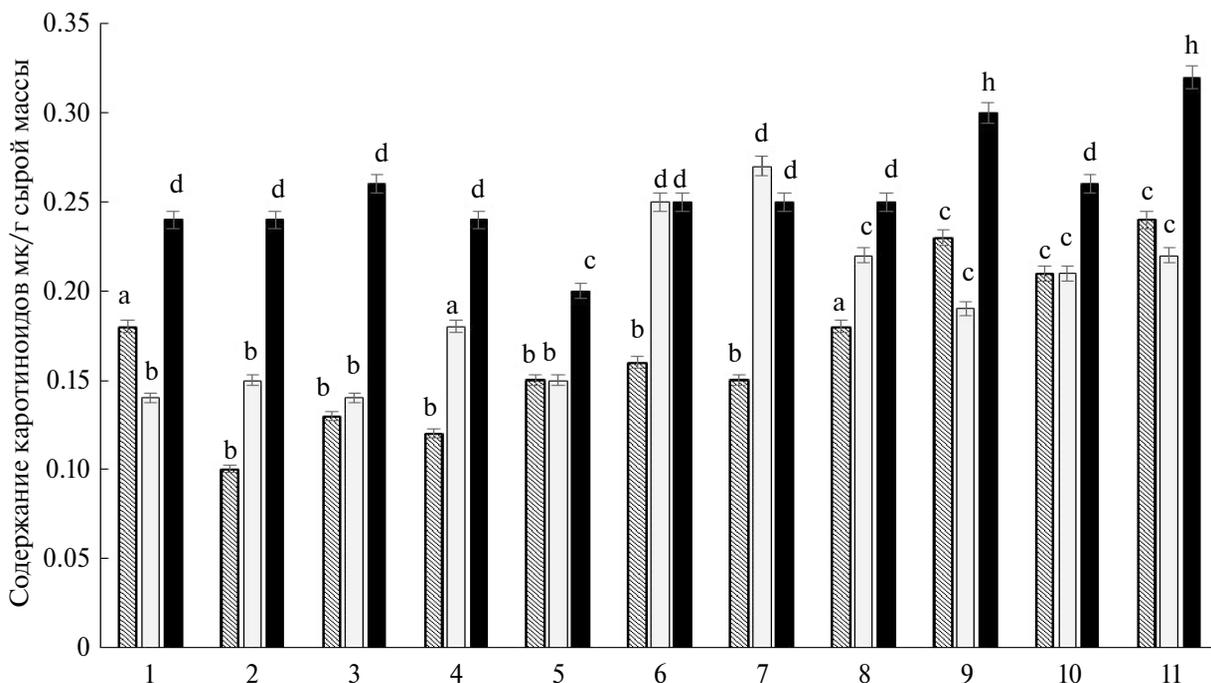


Рис. 5. Влияние 24-эпибрасинолида (ЭБ), 24-эпикаастерона (ЭК), феруловой кислоты (ФК) и их смесей на содержание каротиноидов в растениях яровой пшеницы на 7 (столбики со штриховкой), 14 (светлые столбики) и 21 (черные столбики) сутки от начала обработки растворами веществ. 1 – контроль (вода); 2 – ЭБ, 10^{-9} М; 3 – ЭБ, 10^{-7} М; 4 – ЭК, 10^{-9} М; 5 – ЭК, 10^{-7} М; 6 – ФК, 10^{-9} М; 7 – ФК, 10^{-7} М; 8 – ЭБ+ФК, 10^{-9} М; 9 – ЭБ+ФК, 10^{-7} М; 10 – ЭК+ФК, 10^{-9} М; 11 – ЭК+ФК, 10^{-7} М. Достоверные различия на уровне $P \leq 0.05$ отмечены разными буквами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Совместное воздействие БС и ФК на рост растений пшеницы позволило не только полностью сохранить стимулирующую активность фитогормональных стероидов, но и получить синергический эффект, то есть взаимодействие регуляторов роста проявлялось достаточно сильно. Для выяснения того, как тот или иной гормон осуществляет регуляцию физиологических функций, требуется детальный анализ эндогенного гормонального статуса растения. Предполагается, что регуляторная функция гормонов реализуется в основном через изменение концентрации, которая в каждый определенный момент является результатом процессов синтеза, распада, транспорта, взаимопревращений свободных и связанных форм гормона. Важно знание роли каждого из этих процессов в регуляции концентрации гормона. Особенно это необходимо при использовании экзогенных регуляторов роста, поскольку их эффект зависит от эндогенного содержания фитогормонов, оптимальный уровень которых является важным индикатором нормального роста и развития растений. Обнаруженные нами изменения роста проростков под влиянием БС и ФК могут быть обусловлены, прежде всего, изменением эндогенного уровня фитогормональных стероидов.

Результаты наших экспериментов однозначно свидетельствуют о влиянии ФК на метаболизм БС, поскольку самое высокое содержание фитогормональных стероидов отмечалось при применении смесей, особенно на начальном этапе развития проростков, при самом активном росте. Это явление может быть связано также с повышением биодоступности стероидного гормона в присутствии кислоты, облегчающей его поступление в клетку. Однако для определения механизма этого действия требуются дополнительные исследования.

Положительное взаимодействие в активации роста проростков под влиянием БС и ФК может быть также связано с действием ауксина – регулятора роста растяжением. При стимуляции ростовых процессов отмечается синергическое взаимодействие фитогормональных стероидов с ауксинами [19]. Одним из механизмов такого действия, очевидно, является регуляция ауксинового обмена. Известна способность БС регулировать рост растяжением посредством изменения активности ферментных систем синтеза и распада ИУК [20]. Вместе с тем имеются сведения о том, что нарушение синтеза БС изменяет реакцию ауксина путем воздействия на его транспорт [21]. В свою очередь, фенольные соединения также имеют сродство к ауксину и росту растяжением, обладая способностью регулировать активность ферментных систем био-

синтеза и распада, а также активность ИУК [22]. Следовательно, фенолы, с одной стороны, могут непосредственно влиять на регуляцию роста как биологически активные вещества и, с другой стороны, могут оказывать опосредованное влияние на этот процесс, регулируя метаболизм ИУК и тем самым определяя фитогормональный баланс растительного организма. Показанная нами ростостимулирующая активность ФК может быть связана с защитой ИУК посредством ингибирования активности ауксиноксидазы [23], что поддерживает рост растяжением. Таким образом, ФК и БС ведут себя, как активные регуляторы ауксинового обмена, способствуя биосинтезу и сохранению эндогенного гормона, тем самым стимулируя рост и морфогенез проростков и проявляя в этих процессах синергическое действие.

Изменения роста растений под влиянием фиторегуляторов могут быть обусловлены, помимо изменения эндогенного баланса ростовых гормонов, изменениями на клеточном уровне, что приводит к сдвигу метаболических процессов, которые индуцируют ответные реакции ростовых процессов. Свободнорадикальное, или перекисное, окисление липидов в настоящее время рассматривается как один из доминирующих метаболических процессов, которые обеспечивают регуляцию функциональной деятельности любых физиологических систем организма. Реакции перекисного окисления носят универсальный характер, служат источником энергии, необходимой для жизнедеятельности, и показателем устойчивости метаболических превращений в организме. Продукты ПОЛ участвуют в регулировании проницаемости мембран и регуляции скорости роста организмов [24]. ПОЛ провоцируется избыточным количеством АФК, которые также являются важными регуляторами роста и развития растений [25, 26]. В наших экспериментах у проростков яровой пшеницы под воздействием фиторегуляторов с момента прорастания, вероятно, происходила избыточная генерация АФК, которая сопровождалась интенсификацией процессов ПОЛ, поскольку содержание МДА в проростках было повышено, рост растений активировался. Интересно, что такое действие сходно с действием ауксина. Показано, что ауксин через 15–30 мин после внесения вызывал образование АФК в 3-4-дневных проростках арабидопсиса [27]. Следует также отметить более высокое содержание МДА под влиянием ФК, что согласуется с литературными данными [28]. Однако ростовые процессы у пшеницы в наибольшей степени были выражены при промежуточном содержании МДА под воздействием смесей. Можно предположить, что уровень процессов образования АФК

и реакции ПОЛ у проростков при совместном действии фитогормональных стероидов и ФК оптимален для поддержания ПОЛ в регуляции активности систем поддержания гомеостаза клеток и роста растений. Известно, например, что чрезмерная активация ПОЛ может привести к развитию патологических процессов [29]. Поэтому наблюдаемое нами к концу эксперимента снижение уровня МДА под воздействием БС свидетельствует также об антистрессовом, адаптогенном их действии, которое усиливается при добавлении к фитогормональным стероидам ФК.

Рост растений, формативный, органообразовательный и рост как увеличение биомассы невозможен без функционирования фотосинтетической системы листа. Пигменты занимают центральное место в фотосинтезе, в их отсутствие не происходит поглощение и запасание световой энергии. Количественная оценка содержания и качественный состав пигментов, изменение их соотношений в листьях являются важными и чувствительными показателями физиологического состояния растений и их фотосинтетического аппарата, направленности приспособительных реакций при воздействии различных факторов.

Литературные данные свидетельствуют об усилении синтеза фотосинтетических пигментов под действием экзогенных БС и ФК [30]. В условиях нашего эксперимента под влиянием соединений и их смесей содержание хлорофилла изменялось однонаправленно, возрастая практически на всех стадиях развития проростков яровой пшеницы. Небольшое снижение суммарного содержания хлорофилла *a* и *b* при неизменном соотношении *a/b* в вариантах с использованием смесей по сравнению с индивидуальными соединениями к концу эксперимента, вероятно, связано со снижением синтеза пигментов, а не их деструкцией, что, по мнению некоторых авторов [31], можно рассматривать как адаптационную реакцию растений, позволяющую оптимизировать использование энергии света для фотосинтетических процессов. Как адаптационную реакцию растений, вероятно, следует рассматривать и увеличение содержания каротиноидов под влиянием смесей по сравнению с индивидуальными соединениями. Известно, что ранние стадии биогенеза хлоропластов происходят с образованием АФК, так как пигмент-белковые комплексы и электрон-транспортная цепь еще не сформированы и несовершенна система, препятствующая развитию окислительных реакций [32, с. 88–89]. Для защиты от окислительных повреждений, растения включают защитные механизмы, выражающиеся в росте активности определенных антиоксидантных систем, в том

числе повышение содержания каротиноидов, способствующих не только защите от окислительного стресса, но и большему поглощению света [33]. Перестройки пигментного аппарата под влиянием фиторегуляторов и их смесей были аналогичны специфике развития проростков: наибольшее содержание хлорофилла было обнаружено в растениях на 7 сутки от начала воздействия, и на этой стадии проростки характеризовались наибольшей интенсивностью ростовых процессов. На 14 сутки от начала воздействия содержание хлорофилла и каротиноидов в листьях при обработке смесями не превышало контрольного уровня и в этих же вариантах несколько снижалась интенсивность роста, и в то же время стимулировалось накопление биомассы. Это свидетельствует о том, что между ростом и фотосинтезом существует тесная связь, регулируемая метаболическими и гормональными механизмами. Стимулирующее влияние фитогормональных стероидов и феруловой кислоты на накопление пигментов и усиление эффекта при применении их смесей указывают на то, что БС и ФК, по-видимому, не только влияют на звенья биосинтетической цепи образования пигментов, но и проявляют при этом синергизм действия.

Таким образом, при стимуляции ростовых и метаболических процессов выявлено эффективное взаимодействие БС и феруловых соединений, основой которого является физиологическое поведение в онтогенезе, по крайней мере на начальных его этапах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Х23Р-НФ-087).

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. *Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A.* Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for XXI century // *Ann. Bot.* 2000. V. 86. P. 441.
<https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1227>
2. *Nanstaelen M., Benkova E.* Hormonal interaction in the regulation of plant development // *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012. V. 28. P. 463.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155741>
3. *Litvinovskaya R.P., Minin P.S., Raiman M.E., Zhilitskaya G.A., Kurticova A.I., Kozharnovich K.G., Derevyanchuk M.V., Kravets V.S., Khripach V.A.* Indo-1,3-acetoxy derivatives of brassinosteroids: synthesis

- and growth-regulating activity // *Chem. Nat. Compd.* 2013. V. 49. P. 478.
<https://doi.org/10.1007/s10600-013-0643-8>
4. *Babalic Z.* Increasing of phenolic compounds by brassinosteroid applications in immobilised cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cinsault // *J. Agric. Sci.* 2021. V. 27. P. 298.
<https://doi.org/10.15832/ancutbd.674860>
 5. *Wenjia Xu, Christian Dubos, Loïc Lepiniec.* Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes // *Trends Plant Sci.* 2015. V. 20. P. 176.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.001>
 6. *Ni J., Premathilake A. T., Gao Y., Yu W., Tao R., Teng Y., Bai S.* Ethylene-activated PpERF105 induces the expression of the repressor-type R2R3-MYB gene PpMYB140 to inhibit anthocyanin biosynthesis in red pear fruit // *Plant J.* 2021. V. 105. P. 167.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15049>
 7. *Bajqus A.* Metabolism of brassinosteroids in plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2007. V. 45. P. 95.
<https://doi.org/10.1016/j.plphy.2007/01/02>
 8. *Вольнец А.П.* Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. Минск: Беларуская навука, 2013. 283 с.
 9. *Strack D.* Phenolic metabolism // *Plant biochemistry* / Eds. P.M. Dey, J.B. Harborne. Academic Press. 1997. P. 387.
 10. *Cheyrier V., Comte G., Davis K.M., Lattanzio V., Martens S.* Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. V. 72. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
 11. *Kumar S., Abedin M.M., Singh A.K., Das S.* Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms // *Plant phenolics in sustainable agriculture* / Eds. R. Lone et al. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2020. P. 517.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22517
 12. *Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.* Polyphenols: food sources and bioavailability // *Am. J. Clin. Nutr.* 2004. V. 79. P. 727.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
 13. *Santos W.D., Ferrarese M.L.L., Nakamura C.V., Mourão K.S.M., Mangolin C.A., Ferrarese Filho O.* Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action // *J. Chem. Ecol.* 2008. V. 34. P. 1230.
<https://doi.org/10.1007/310886-008-9522-3>
 14. *Cheng Z.Y., Sun L., Wang X.J., Sun R., An Y.Q., An B.L., Zhu M.X., Zhao L.F., Bai J.G.* Ferulic acid pretreatment alleviates heat stress in blueberry seedlings by inducing antioxidant enzymes, proline, and soluble sugars // *Biol. Plant.* 2018. V. 62. P. 534.
<https://doi.org/10.1007/s10535-018-0772-9>
 15. *Лобков В. Г., Наполова Г.В.* Способ определения хлорофилла в растениях гречихи. РФ Патент 244916, 2005.
 16. *De Vos C.H.R., Schat H., Vooijs R., Ernst W.H.O.* Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus* // *J. Plant Physiol.* 1989. V. 135. P. 164.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80171-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80171-3)
 17. *Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Litvinovskaya R.P.* Immunoassays of brassinosteroids // *Brassinosteroids: a class of plant hormones* / Eds. S. Hayat, A. Ahmad. Springer. 2011. P. 375.
 18. *Pradko A.G., Litvinovskaya R.P., Sauchuk A.L., Drach S.V., Baranovsky A.V., Zhabinskii V.N., Mirantsova T.V., Khripach V.A.* A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants // *Steroids.* 2015. V. 97. P. 78.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.022>
 19. *Bao F., Shen J.J., Brady S.R., Muday G.K., Asami T., Yang Z.B.* Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 1624.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.036897>
 20. *Nakamura A., Higuchi K., Goda H., Fujiwara M.T., Sawa S., Koshiha T., Shimada Y., Yoshida S.* Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in *Arabidopsis*, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. P. 1843.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.030031>
 21. *De Grauwe L., Vandenbussche F., Tietz O., Palme K., Van Der Straeten D.* Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in the *Arabidopsis* hypocotyl // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 827.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pci111>
 22. *Вольнец А.П.* Фенольная регуляция ауксинового обмена в растениях // Доклады АН Беларуси. 1994. Т. 38. С. 68.
 23. *Machakova I., Zazimalova E., George F.* Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors // *Plant propagation by tissue culture* / Eds. E.F. George, M.A. Hall, G.-J. de Klerk. Springer. 2008. P. 175.
 24. *Sharova E.I., Medvedev S.S.* Redox reactions in apoplast of growing cells // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 1.
<https://doi.org/10.1134/S1021443717010149>
 25. *Gapper C., Dolan L.* Control of plant development by reactive oxygen species // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 341.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.079079>
 26. *Breygina M., Schekaleva O., Klimenko E., Luneva O.* The balance between different ROS on tobacco stigma during flowering and its role in pollen germination // *Plants.* 2022. V. 11. P. 993.
<https://doi.org/10.3390/plants11070993>
 27. *Schopfer P., Liskay A., Bechtold M., Frahry G., Wagner A.* Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth // *Planta.* 2002. V. 214. P. 821.
<https://doi.org/10.1007/s00425001-099-8>
 28. *Олениченко Н.А., Городкова Е.С., Загоскина Н.В.* Влияние экзогенных фенольных соеди-

- нений на перекисное окисление липидов у расте-
ний пшеницы // Сельскохозяйственная биология.
2008. № 3. С. 58.
29. *Gill 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>
30. *Siddiqui H., Hayat S., Bajguz A.* Regulation of photo-
synthesis by brassinosteroids in plants // *Acta Physiol.*
Plant. 2018. V. 40. P. 59.
<https://doi.org/10.1007/s11738-018-2639-2>
31. *Каляга Т.Г., Козел Н.В.* Влияние почвенной засу-
хи на содержание фотосинтетических пигментов
в растениях ячменя сорта Бровар // *Журнал Бело-
русского государственного университета. Биоло-
гия.* 2020. № 3. С. 46.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-46-53>
32. *Кабаникова Л.Ф.* Фотосинтетический аппарат
и стресс у растений. Минск: Беларуская навука,
2014. 267 с.
33. *Маслова Г.Г., Марковская Е.Ф., Слемнев Н.Н.*
Функции каротиноидов в листьях высших рас-
тений (Обзор) // *Журнал общей биологии.* 2020.
Т. 81. С. 297.
<https://doi.org/10.31857/s0044459620040065>

УДК 581.1;635.21;58.035.4;58.084.1

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ КРАСНОГО И ДАЛЬНОГО КРАСНОГО СВЕТА НА РОСТ, СОДЕРЖАНИЕ ПИГМЕНТОВ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА У КРЕСС-САЛАТА

© 2024 г. Т. Н. Лисина^{а,*}, О. А. Четина^б, В. А. Парфенкова^б,
О. В. Бурдышева^а, Е. С. Шолгин^а

^аПермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук,
Пермь, Россия,

^бПермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

*e-mail: atea2@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.10.2023 г.

После доработки 15.11.2023 г.

Принята к публикации 16.11.2023 г.

Дальний красный свет – это электромагнитное излучение с длиной волны 700–800 нм. Свет таких длин волн не входит в диапазон ФАР, но выполняет информационную роль для растений и опосредованно влияет на интенсивность фотосинтеза. В данной работе представлены результаты эксперимента по выращиванию кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) в условиях освещения с разным соотношением красного и дальнего красного света (КС/ДКС) в общем спектре освещения. Рассмотрены варианты разного соотношения КС/ДКС = 1.1; КС/ДКС = 0.8; КС/ДКС = 0.5. Изучено влияние соотношения КС/ДКС на длину растений, содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях, интенсивность фотосинтеза. Показано, что понижение соотношения КС/ДКС в освещении приводит к удлинению растений кресс-салата, снижает содержание фотосинтетических пигментов. Освещение с соотношениями КС/ДКС = 0.8 и КС/ДКС = 0.5 при этом не снижает интенсивность фотосинтеза (на 14 сутки эксперимента), что может быть рассмотрено как положительное влияние. Освещение с соотношением КС/ДКС = 1.1 привело к снижению интенсивности фотосинтеза, вероятно, за счет значимого снижения содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях растений.

Ключевые слова: *Lepidium sativum*, дальний красный свет, спектральный состав света, интенсивность фотосинтеза, фотосинтетические пигменты, фитохромы

DOI: 10.31857/S0015330324030047, EDN: NMMHUQ

ВВЕДЕНИЕ¹

Свет является необходимым источником получения энергии для растений. Под светом мы понимаем электромагнитное излучение в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм. Эту область называют фотосинтетически активной радиацией (ФАР). Дальний красный свет (ДКС) – длинноволновая радиация в диапазоне 700–800 нм. Этот диапазон находится между красным (КС) и инфракрасным светом и не входит в область ФАР, потому ранее было принято считать, что ДКС не оказывает влияния на фотосинтез. Но ДКС дает растениям информацию об окружающей среде, следовательно, опосредованно влияет на процессы роста и развития растений, особенно в затененных средах [1]. Фотосинтетические пигменты интенсивно поглощают ФАР, но пропускают большую часть фотосинтетиче-

ски неэффективного излучения, к которому относится ДКС [2].

В природе свет, обогащенный ДКС, бывает под пологом других растений. Если ДКС много, то это сигнал о близости более высоких соседних растений. Но в то же время есть надежда, что где-то рядом обнаружится свободный (еще не занятый другими растениями) участок. Еще до того, как растения будут затенены, небольшое количество дополнительного ДКС, отраженного соседними растениями, воспринимается фитохромами как сигнал раннего предупреждения о конкуренции [3]. Когда фоторецепторы растения получают информацию об увеличении доли ДКС, запускается “синдром избегания тени” (shade avoidance syndrome, SAS): удлинение черешков, междоузлий, появление гипонастических листьев и бледно-зеленой окраски, вызванной неполным формированием фотосинтетического аппарата [2]. Теневыносливые

¹Сокращения: ДКС – дальний красный свет, КС – красный свет.

растения не проявляют подобной реакции [4]. Вместо этого теневыносливые виды максимизируют улавливание радиации за счет расширения листьев, что сопровождается уменьшением толщины листовой пластины и увеличением доли биомассы в листьях [5].

Фоторецепторами “красной” части спектра у растений являются фитохромы, разные формы которых регистрируют и КС, и ДКС части спектра [6], поэтому имеет значение не абсолютное значение количества фотонов ДКС, попадающее на растение, а соотношение КС и ДКС (КС/ДКС).

Хотя фотоны ДКС слабо или неэффективно стимулируют фотосинтетическую реакцию [7], низкий уровень соотношения КС/ДКС, воспринимаемый фоторецепторами фитохромов, может вызывать существенные изменения в экспрессии генов и физиологических процессах. Вопрос об оптимальном соотношении КС/ДКС для получения наибольшего урожая для конкретной культуры обсуждается в научном сообществе и представляет большой научный интерес. Исследователи во всем мире изучают диапазон соотношения КС/ДКС для разных культур, имеющих значение в сельском хозяйстве [8–10]. ДКС регулирует морфологию и фотосинтетическую способность растений [11]. Выявление механизма этого регулирования может привести к повышению урожайности сельскохозяйственных культур [12].

На сегодняшний день большинство исследований сосредоточено на влиянии ДКС на морфологические характеристики растений, содержание фотосинтетических пигментов, флуоресценцию хлорофилла и другие показатели, как при возделывании полей, так и при культивировании растений в защищенном грунте. Зафиксировано влияние ДКС на площадь листьев [13], длину черешка и угол листа [14, 15], длину междоузлий [16], толщину листа [9], устьичную проводимость [17]. Однако, влияние ДКС на регуляцию устьиц является спорным [18]. Добавление ДКС в освещение может увеличить биомассу растений [19]. Снижение соотношения КС/ДКС способствует распределению сухого вещества растения по стеблю [20]. Ведутся работы по изучению влияния дальнего красного света на количество и структуру хлоропластов [21]. Продемонстрирована важная роль электрохимических мембранных процессов в регуляции фотосинтетического транспорта электронов у микроводорослей [22]. Доказано, что ДКС поддерживает выделение кислорода из листьев подсолнечника и фасоли [23].

В некоторых исследованиях [24] изучалось влияние ДКС на фотосистему и фотосинтетический транспорт электронов. Выявление фи-

зиологических механизмов, с помощью которых дальний красный свет влияет на фотосинтетическую способность растений, может привести к увеличению урожайности сельскохозяйственных культур. У многих культур в ответ на низкое соотношение КС/ДКС наблюдается ускоренное цветение, что также можно использовать как регуляторный фактор в сельском хозяйстве и садоводстве.

Цель данного экспериментального исследования – установить влияние разного соотношения КС/ДКС в спектре освещения на рост и интенсивность фотосинтеза кресс-салата, определить оптимальное соотношение КС/ДКС для культивирования кресс-салата в условиях светокультуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сотрудниками лаборатории агробиофотоники Пермского НИИСХ ПФИЦ УрО РАН сконструирован гроубокс, состоящий из четырех секторов. Секторы между собой изолированы светоотражающей поверхностью. Фотопериод 16/8 часов реализован при помощи механического таймера Systec. В качестве базового освещения использованы светодиодные светильники ECOLED-BIO-37-RF-D120-F-Trade IP65 (4000 К). Для внесения дополнительной спектральной составляющей к базовому освещению использованы линейки со светодиодами длиной волны 730 нм, которые закреплены рядом с основными лампами.

Секторы гроубокса отличаются соотношением красного и дальнего красного света (КС/ДКС) в спектре. Регистрация спектра освещения в секторах гроубокса проведена портативным спектрометром MK350S Premium. В первом секторе только базовое освещение (контроль), соотношение КС/ДКС = 9.9. Во втором секторе соотношение КС/ДКС = 1.1, в третьем секторе – 0.8, в четвертом секторе – 0.5 (рис. 1).

В качестве объекта исследования выбран кресс-салат (*Lepidium sativum* L.) – съедобное однолетнее или двулетнее травянистое растение семейства Капустные, или Крестоцветные. Кресс-салат является распространенным модельным растением, обладающим повышенной чувствительностью к разного рода стрессам (загрязнение, нехватка влаги, света и т.д.), а также хозяйственно-ценной культурой, так как обладает рядом полезных для человека свойств. Тест-растения выращивали в пластиковых контейнерах высотой 50 мм и площадью нижнего поперечного сечения (дна) – 50 мм × 80 мм, верхнего поперечного сечения – 70 мм × 95 мм, в качестве субстрата использовали вермикулит. В каждый контейнер вносили по 0.5 г семян кресс-салата, однократно увлажняли раствором

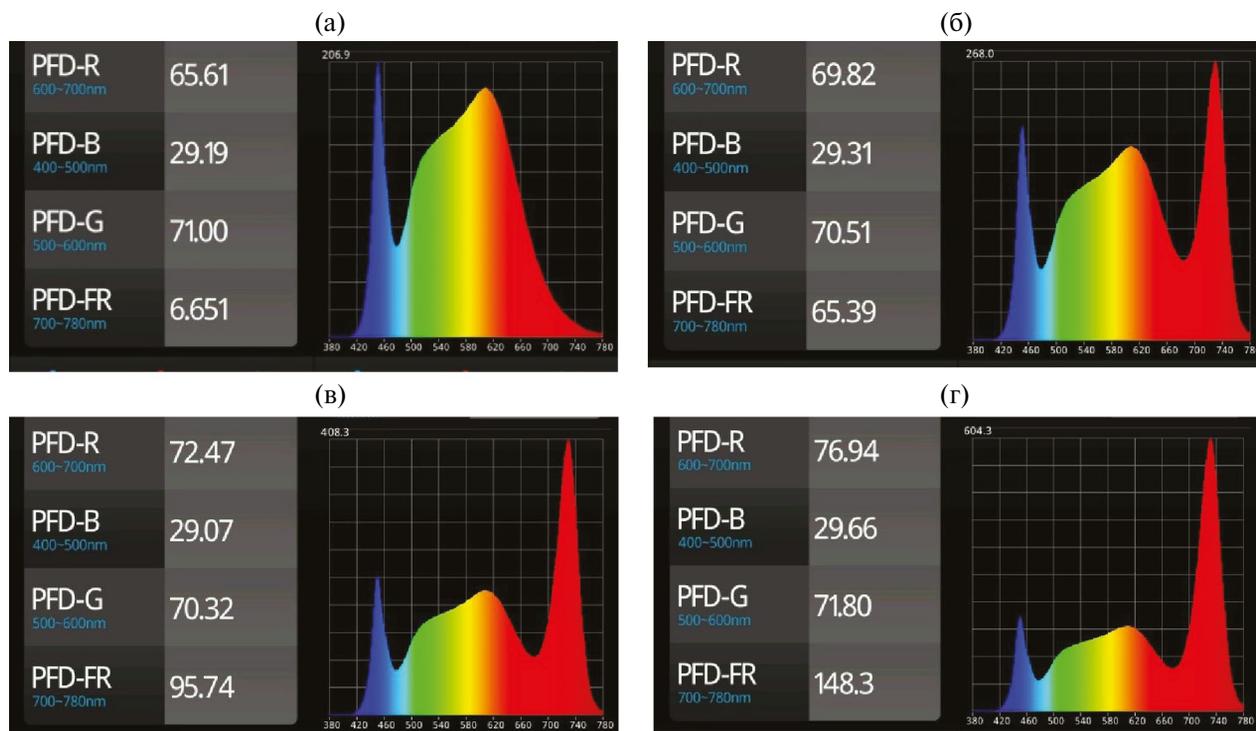


Рис. 1. Спектральный состав освещения в секторах гроубокса. а) сектор 1 (КС/ДКС = 9.9); б) сектор 2 (КС/ДКС = 1.1); в) сектор 3 (КС/ДКС = 0.8); г) сектор 4 (КС/ДКС = 0.5). PFD-R – поток фотонов в “красной зоне”, мкмоль/(м² с). PFD-B – поток фотонов в “синей зоне”, мкмоль/(м² с). PFD-G – поток фотонов в “зеленой зоне”, мкмоль/(м² с). PFD-FR – поток фотонов в “дальней красной зоне”, мкмоль/(м² с).

Кнопка в количестве 25 мл (далее поливали дистиллированной водой по мере необходимости) и выращивали при температуре 25°C и длине светового дня 16 ч. Контейнеры с растениями располагались непосредственно под источниками освещения (рис. 2).

Снятие результатов проводили на 4, 7 и 14 сутки с момента посадки. Длину надземной части определяли путем измерения 60 растений. Количество пигментов определяли спектрофотометрическим методом при длинах волн 665, 649 и 440 нм в ацетоновой вытяжке. Для расчета концентрации хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов использовали формулы Винтерманса де Мотса [25]. Интенсивность фотосинтеза оценивали фотоколориметрически по содержанию углерода в листьях путем мокрого сжигания в хромовой смеси [26]. Опыты проводили в 3-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторностях.

Полученные данные обработаны с применением методов описательной статистики, критериев Стьюдента и сдвига/положения для определения достоверности различий между вариантами (в зависимости от нормальности распределения выборки). Значимыми считали различия между сравниваемыми величинами с доверительной вероятностью 95% и выше ($P \leq 0.05$).

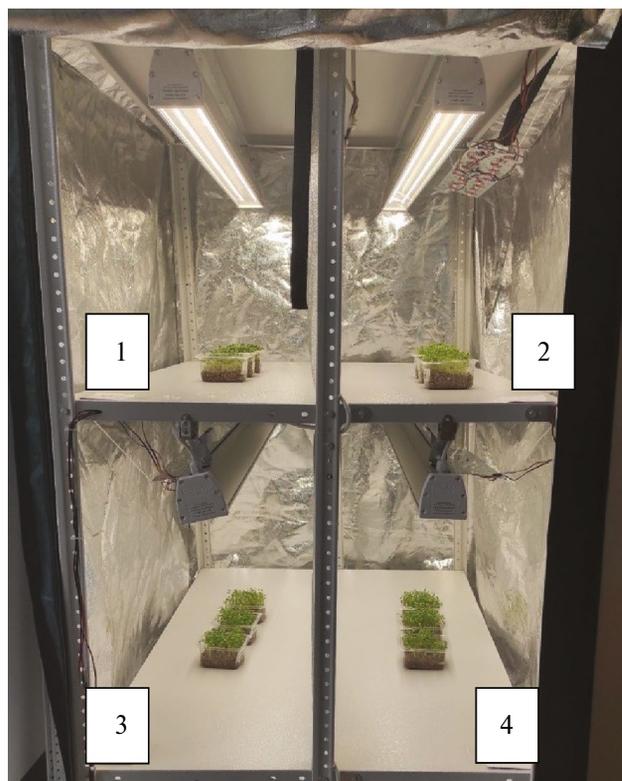


Рис. 2. Внешний вид растений в гроубоксе на 7 сутки эксперимента. Цифрами обозначены номера секторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследований по длине наземной части представлены на рис. 3. Измерения длины надземной части растений были проведены на 4, 7 и 14-е сут эксперимента. На 4 сутки всходы растений из разных секторов гроубокса не имели статистически достоверных отличий между собой ($P = 0.09–0.99$). На 7 сут зафиксированы достоверные отличия по этому показателю между растениями из разных секторов. Увеличение длины надземной части на 7 сут по сравнению с контролем было тем больше, чем ниже соотношение КС/ДКС. На 14 сутки эксперимента различия по длине надземной части у растений между секторами со светодиодной досветкой ДКС уже не имели большого значения. Между длиной растений из секторов КС/ДКС = 1.1 и КС/ДКС = 0.8 статистически достоверных различий нет, но растения без досветки ДКС (контроль) значимо уступали по этому показателю растениям, выращенным с досветкой ДКС. Таким образом, снижение соотношения КС/ДКС до 1.1–0.5 достоверно приводит к увеличению длины растения кресс-салата.

Определение содержания пигментов проводилось на 7 и 14 сут эксперимента. Статистически достоверные отличия по содержанию хлорофиллов и каротиноидов зафиксированы уже на 7-е сут эксперимента (рис. 4–6). Эта тенденция к снижению сохранилась и на 14-е сут эксперимента. Различия по содержанию хлорофилла *a* и каротиноидов в листьях растений салата достоверны между всеми вариантами соотношения КС/ДКС на 14 сутки эксперимента. Различия по содержанию хлорофилла *b* достоверны на 14 сут только у секторов с соотношением КС/ДКС = 1.1 и КС/ДКС = 0.8.

Интенсивность фотосинтеза определяли на 4, 7 и 14-е сут эксперимента. Зафиксировано достоверное увеличение интенсивности фотосинтеза на 4 сут эксперимента у растений экспериментальных секторов с досветкой ДКС по сравнению с контролем. На 7 сут эксперимента интенсивность фотосинтеза растений с наименьшим из использованных соотношений КС/ДКС = 0.5 статистически не отличалась от контроля. Интенсивность фотосинтеза, зарегистрированная у растений секторов с соотношением КС/ДКС = 1.1 и КС/ДКС = 0.8, была еще достоверно выше по сравнению с контролем, но наметилась тенденция к уменьшению разницы. На 14 сут эксперимента интенсивность фотосинтеза растений из секторов с соотношением КС/ДКС = 0.8 и КС/ДКС = 0.5 не имела достоверных отличий по сравнению с контролем, а интенсивность фотосинтеза растений из сектора с соотношением КС/ДКС = 1.1 была достоверно ниже, чем в контроле (рис. 7).

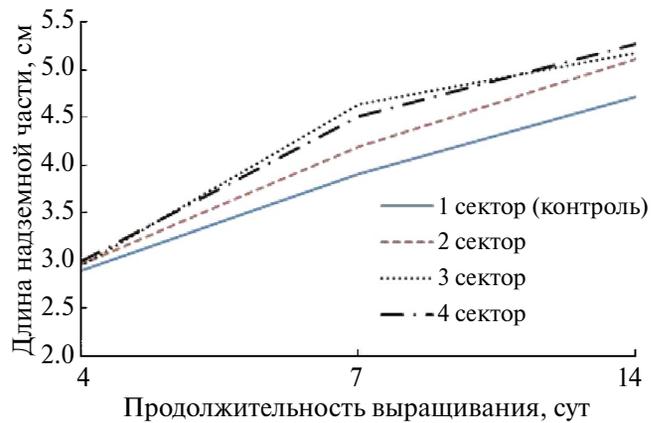


Рис. 3. Длина надземной части кресс-салата при освещении с разным соотношением КС/ДКС.

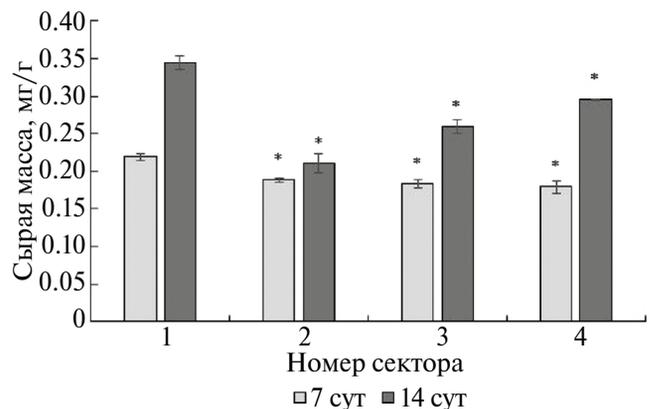


Рис. 4. Содержание каротиноидов в листьях кресс-салата при освещении с разным соотношением КС/ДКС. Звездочкой отмечены значимые различия с контрольным вариантом.

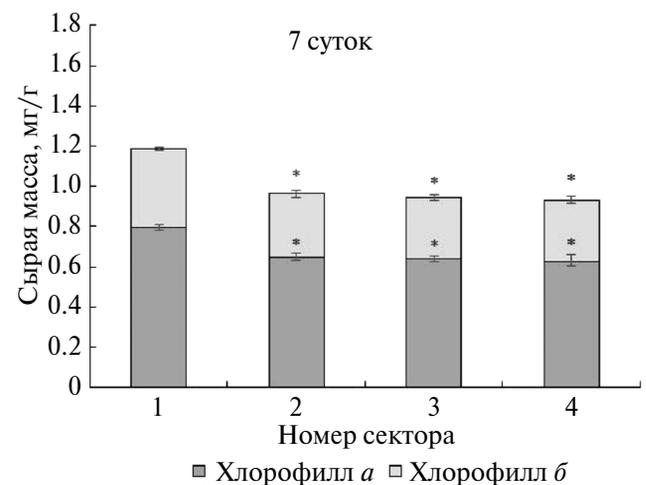


Рис. 5. Содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях кресс-салата при освещении с разным соотношением КС/ДКС на 7 сутки исследования. Звездочкой отмечены значимые различия с контрольным вариантом.

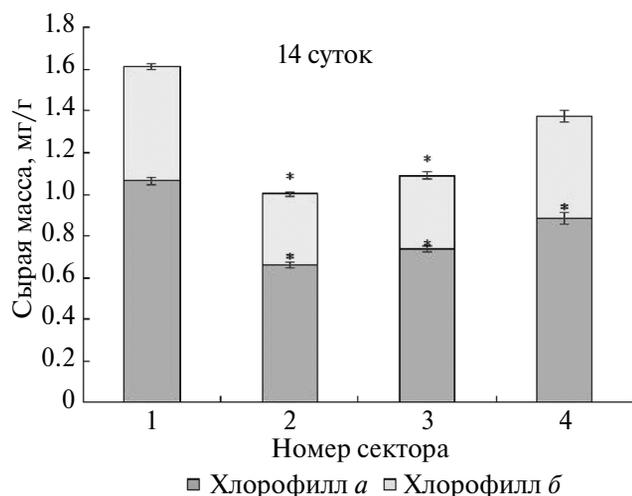


Рис. 6. Содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях кресс-салата при освещении с разным соотношением КС/ДКС на 14 сутки исследования. Звездочкой отмечены значимые различия с контрольным вариантом.

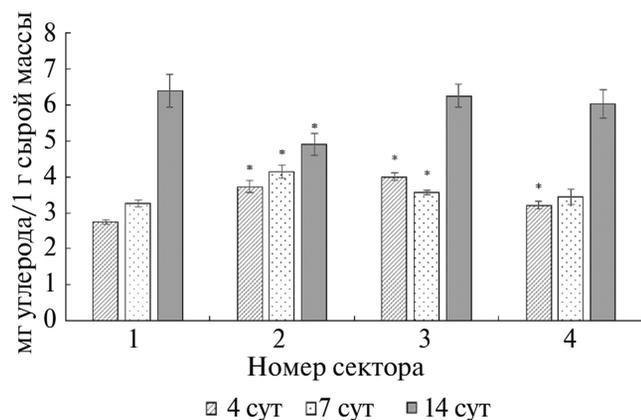


Рис. 7. Интенсивность фотосинтеза по содержанию углерода в листьях кресс-салата при освещении с разным соотношением КС/ДКС.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном экспериментальном исследовании на примере кресс-салата продемонстрировано и подтверждено увеличение длины растений в ответ на снижение соотношения КС/ДКС в общем спектре освещения. Отмечено, что на 7 сут эксперимента различия в соотношении КС/ДКС больше определяют различия в длине растений, чем на 14 сутки эксперимента. На 14 сут эксперимента зафиксировано, что все три варианта досветки ДКС приводят к достоверно большей длине растения. Растения, выращенные в условиях с высоким соотношением КС/ДКС = 9.9, уступают растениям, выращенным в условиях освещения с пониженным соотношением КС/ДКС. В целом, фактор увеличения роста можно рассматривать как желаемый признак, но не у всех сельскохозяйственных

культур, так как удлинение не всегда приводит к увеличению общей биомассы растений. Реакции избегания тени также индуцируются у агрономических культур при монокультурах с высокой плотностью и могут привести к тому, что культуры будут более склонны к засухе и полеганию, а также отрицательно повлияют на урожайность, поэтому их иногда считают нежелательными [27].

В результате исследования зафиксировано снижение содержания хлорофилла *a* и *b* у растений в секторах грубокса с досветкой ДКС по сравнению с растениями в контрольном варианте. Это явление обнаружено как на 7 сут эксперимента, так и на 14 сут. Снижение концентрации хлорофиллов в листьях является почти универсальной реакцией на облучение ДКС среди широкого круга видов [28]. Было предложено несколько гипотез снижения содержания хлорофилла: эффект “разбавления”, когда под действием ДКС происходит расширение листьев, и прямое влияние на биосинтез хлорофилла из-за уменьшения количества фитохромов формы ДКС относительно общего количества фитохромов [28]. Стимулирующий эффект дальних красных фотонов на расширение листьев, вероятно, способствовал “разбавлению” содержания хлорофилла на единицу площади листа.

Содержание каротиноидов достоверно снизилось у растений в секторах с досветкой ДКС, независимо от соотношения КС/ДКС. Различия были так же достоверны и у растений между секторами с разным соотношением, что говорит о непосредственном влиянии соотношения КС/ДКС в диапазоне 1.1–0.5 на содержание каротиноидов. Каротиноиды могут передавать энергию хлорофиллу для фотосинтеза и защищать хлорофилл от фотоокисления [29]. Как и содержание хлорофилла, содержание каротиноидов варьируется у разных растений при увеличении ДКС. Возможно, яркий ДКС может приводить к сверхэкспрессии мРНК и уровням белков, обогащающих ткани каротиноидами [30].

На 4 сут эксперимента досветка ДКС (во всех трех изученных вариантах КС/ДКС = 1.1, КС/ДКС = 0.8 и КС/ДКС = 0.5) обеспечивала достоверное увеличение интенсивности фотосинтеза по содержанию углерода в листьях. На 7 сут эксперимента этот эффект ослаблялся. На 14 сут эксперимента растения из секторов с соотношением КС/ДКС = 0.8 и КС/ДКС = 0.5 не отличались по интенсивности фотосинтеза от контроля, а растения из сектора с соотношением КС/ДКС = 1.1 имели достоверно более низкую интенсивность. Предположительно, это произошло вслед за снижением содержания хлорофилла на единицу массы листа. Хлорофилл участвует в поглощении, передаче и преобразовании световой энергии, а содержание и состав хлоро-

филла напрямую влияют на фотосинтетическую способность листьев.

В данном исследовании показано влияние снижения соотношения КС/ДКС на длину растений салата, содержание пигментов в листьях кресс-салата и интенсивность фотосинтеза. Рассмотрены соотношения КС/ДКС: 1.1, 0.8, 0.5. В ряде случаев различия по изученным показателям у растений, выращенных под освещением с соотношением КС/ДКС = 1.1 и КС/ДКС = 0.8, не имели достоверных различий между собой. Но при этом любой из трех изученных вариантов пониженного соотношения имел достоверные отличия с контролем (КС/ДКС = 9.9).

Освещение с соотношением КС/ДКС = 1.1 привело к значимому снижению содержания пигментов, что, вероятно, привело к снижению интенсивности фотосинтеза, поэтому вариант с таким соотношением нельзя считать благоприятным для культивирования кресс-салата в условиях светокультуры. Освещение с соотношениями КС/ДКС = 0.8 и КС/ДКС = 0.5 приводит к большей длине и не снижает интенсивность фотосинтеза (на 14 сут эксперимента), что может быть рассмотрено как положительное влияние.

Т.Н. Лисина спланировала эксперимент, определила параметры эксперимента, оформила текст статьи. О.В. Бурдышева и Е.С. Шолгин сконструировали гроубокс и настроили требуемое освещение. В.А. Парфенкова и О.А. Четина выполнили лабораторную часть эксперимента и обработали результаты эксперимента.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного задания, номер государственной регистрации НИОКТР 122031100058-3.

Благодарим компанию “ЭКОЛЕД-Трейд” за предоставленные для исследования светодиодные светильники ECOLED-BIO-37-RF-D120-F-Trade IP65 (4000K).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park Y., Runkle E.S. Far-red radiation promotes growth of seedlings by increasing leaf expansion and whole-plant net assimilation // *Environ. Exp. Bot.* 2017. V. 136. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.12.013>
2. Casal J.J. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 403. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120221>
3. Ballaré C.L., Sánchez R.A., Scopel A.L., Casal J.J., Ghersa C.M. Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight // *Plant Cell Environ.* 1987. V. 10. P. 551.
4. Войцеховская О.В. Фитохромы и другие (фото)рецепторы информации у растений // *Физиология растений.* 2019. Т. 66. С. 163. <https://doi.org/10.1134/S0015330319030151>
5. Gommers C.M., Visser E.J., St Onge K.R., Voeseinek L.A., Pierik R. Shade tolerance: when growing tall is not an option // *Trends Plant Sci.* 2013. V. 18. P. 6. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.008>
6. Smith H. Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis // *Nature.* 2000. V. 407. P. 585
7. Emerson R., Chalmers R., Cederstrand C. Some factors influencing the long-wave limit of photosynthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1957. V. 43. P. 133. <https://doi.org/10.1073/pnas.43.1.133>
8. Shibuya T., Endo R., Yuba T., Kitaya Y. The photosynthetic parameters of cucumber as affected by irradiances with different red:far-red ratios // *Biol. Plant.* 2015. V. 59. P. 198.
9. Lee M.J., Park S.Y., Oh M.M. Growth and cell division of lettuce plants under various ratios of red to far-red light-emitting diodes // *Hortic., Environ. Biotechnol.* 2015. V. 56. P. 186.
10. Калашикова Е.А., Киракосян Р.Н., Десятерик А.А., Ганаева Д.Р., Абубакаров Х.Г., Слепцов Н.Н. Роль светового режима в регулировании продукционного процесса растений в системе интенсивного культивирования in vitro // *Естественные и технические науки.* 2021. № 5 (156). С. 64.
11. Bulychev A.A., Osipov V.A., Matorin D.N., Vredenberg W.J. Effects of farred light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished ΔpH and $\Delta \phi$ components of the proton motive force // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2013. V. 45. P. 37. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9476-6>
12. Tan T., Li S., Fan Y., Wang Z., Ali Raza M., Shafiq I., Wang B., Wu X., Yong T., Wang X., Wu Y., Yang F., Yang W. Far-red light: A regulator of plant morphology and photosynthetic capacity // *The Crop Journal.* 2022. V. 10 (2). P. 300. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.06.007>
13. Kasperbauer M.J., Peaslee D.E. Morphology and photosynthetic efficiency of tobacco leaves that received end-of-day red and far red light during development // *Plant Physiol.* 1973. V. 52. P. 440.
14. Kalaitzoglou P., Ieperen W., Harbinson J., van der Meer M., Martinakos S., Weerheim K., Nicole C.C.S., Marcelis L.F.M. Effects of continuous or end-of-day far-red light on tomato plant growth, morphology, light absorption, and fruit production // *Frontiers in Plant Science.* 2019. V. 10. P. 322. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00322>
15. Hitz T., Hartung J., Graeff-Hoenninger S., Munz S. Morphological response of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars to light intensity and red to far-red ra-

- tio // *Agronomy*. 2019. V. 9. P. 428.
<https://doi.org/10.3390/agronomy9080428>
16. *Kurepin L.V., Walton L.J., Reid D.M., Pharis R.P., Chinnappa C.C.* Growth and ethylene evolution by shade and sun ecotypes of *Stellaria longipes* in response to varied light quality and irradiance // *Plant, Cell Environ.* 2006. V. 29. P. 647.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01443.x>
 17. *Shibuya T., Endo R., Kitamura Y., Kitaya Y., Hayashi N.* Potential photosynthetic advantages of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings grown under fluorescent lamps with high red:far-red light // *HortScience*. 2010. V. 45. P. 553.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.4.553>
 18. *Karlsson P.E.* Phytochrome is not involved in the red-light-enhancement of the stomatal blue-light-response in wheat seedlings // *Physiol. Plant.* 1988. V. 74. P. 544.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb02016.x>
 19. *Zou J., Zhang Y.T., Zhang Y.Q., Bian Z.H., Fannourakis D., Yang Q.C., Li T.* Morphological and physiological properties of indoor cultivated lettuce in response to additional far-red light // *Sci. Hortic.* 2019. V. 257. P. 108725.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108725>
 20. *Yang Z.Q., Zhang J.B., Li Y.X., Peng X.D., Zhang T.H., Zhang J.* Effects of red/far red ratio on morphological index, leaf area and dry matter partitioning of cut chrysanthemum flower // *Acta Ecologica Sinica*. 2012. V. 32. P. 2498.
<https://doi.org/10.5846/stxb201110151529>
 21. *Chang N., Gao Y.F., Zhao L., Liu X.M., Gao H.B.* Arabidopsis FHY3/CPD45 regulates far-red light signaling and chloroplast division in parallel // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 9612.
<https://doi.org/10.1038/srep09612>
 22. *Ленбаум В.В., Булычев А.А., Маторин Д.Н.* Влияние дальнего красного света на индукционные изменения быстрой и замедленной флуоресценции и редокс-состояния р700 у *Scenedesmus quadricauda* // *Физиология растений*. 2015. Т. 62. С. 229.
<https://doi.org/10.7868/S001533031502013X>
 23. *Pettai H., Oja V., Freiberg A., Laisk A.* Photosynthetic activity of far-red light in green plants // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1708 (3). P. 311.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.05.005>
 24. *Stoylova S., Flint T.D., Ford R.C., Holzenburg A.* Structural analysis of photosystem II in far-red-light-adapted thylakoid membranes: New crystal forms provide evidence for a dynamic reorganization of light-harvesting antennae subunits // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 207.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00996.x>
 25. *Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В.* Большой практикум по фотосинтезу. М.: Академия, 2003. 254 с.
 26. *Аликов Х.К.* Фотокolorиметрический метод определения содержания углерода в листьях мокрым сжиганием в хромовой смеси // *Методы комплексного изучения фотосинтеза*. Л., 1983. Вып. 2. С. 6.
 27. *Morgan P.W., Finlayson S.A., Childs K.L., Mullet J.E., Rooney W.L.* Opportunities to improve adaptability and yield in grasses // *Crop Sci.* 2002. V. 42. P. 1791.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1791>
 28. *Zhen S., Bugbee B.* Substituting far-red for traditionally defined photosynthetic photons results in equal canopy quantum yield for CO₂ fixation and increased photon capture during long-term studies: implications for re-defining PAR // *Frontiers in Plant Science*. 2020. V. 11. P. 581156.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.581156>
 29. *Polívka T., Frank H.A.* Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids // *Acc. Chem. Res.* 2010. V. 43. P. 1125.
<https://doi.org/10.1021/ar100030m>
 30. *Biswal U.C., Bergfeld R., Kasemir H.* Phytochrome-mediated delay of plastid senescence in mustard cotyledons: changes in pigment contents and ultrastructure // *Planta*. 1983. V. 157. P. 85.

УДК 581.1

ИЗОЛИРОВАННЫЕ КУЛЬТУРЫ ЗЕЛЕННЫХ КОРНЕЙ *Triticum aestivum* L. СПОСОБНЫ К НЕОГРАНИЧЕННОМУ РОСТУ НА БЕЗГОРМОНАЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

© 2024 г. В. М. Александрова^{a, b, *}, Г. Р. Гумерова^a, Х. Г. Мусин^a,
З. А. Бережнева^a, А. А. Галимова^a, Б. Р. Кулуев^{a, b}

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

^bФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Уфимский университет науки и технологий”, Уфа, Россия
*e-mail: alek_vlm@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.2024 г.

После доработки 03.03.2024 г.

Принята к публикации 26.03.2024 г.

При культивировании каллусов, полученных из зрелых зародышей яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Фишт, иногда происходила спонтанная регенерация хлорофилл-содержащих корней зеленого цвета. При изоляции от каллуса эти корни были способны к неограниченному росту на безгормональных питательных средах, подобно культурам волосовидных корней двудольных растений. Обычные корни пшеницы при таких условиях не росли, тогда как зеленые корни продолжали свой рост даже при действии 100 мМ NaCl. В паренхимных клетках зеленых корней пшеницы были обнаружены типичные хлоропласты. В зеленых корнях пшеницы было обнаружено примерно равное количество хлорофиллов *a* и *b*, однако их общее содержание было в десятки раз меньше, чем в листьях. Зеленые корни характеризовались большим содержанием пролина и более высокой активностью супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы, чем обычные корни пшеницы, как в норме, так и при засолении. Зеленые корни могут стать альтернативой волосовидным корням, которые очень трудно получить у злаковых и других однодольных, с целью их использования как в фундаментальных исследованиях, так и в прикладных целях.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, мягкая пшеница, фотосинтезирующие корни, фотосинтез, хлоропласты, антиоксидантная система

DOI: 10.31857/S0015330324030056, EDN: NMLYZX

ВВЕДЕНИЕ

Растения постоянно корректируют программу своего развития для адаптации к внешней среде, формируя новые органы в различных условиях развития. Корни растений обычно растут под землей как гетеротрофные органы и зависят от надземных органов, от которых они получают фотоассимиляты. В то же время в природе обнаруживаются различные специализированные корни, некоторые из которых кроме поглощения воды осуществляют также активный фотосинтез. В качестве примера можно привести воздушные корни эпифитов и лиан, преимущественно произрастающих в тропических лесах. Воздушные корни характерны для ряда комнатных растений, у которых они формируются в основном при высокой влажности [1]. Таким образом, воздушные корни – это чаще всего признак тропического

происхождения растения и адаптации к жизни в условиях высокой влажности и недостатка питательных веществ, однако лишь некоторые из таких корней способны к активному фотосинтезу. Из широко культивируемых комнатных растений фотосинтезирующие корни имеют некоторые орхидеи, в связи с чем для их выращивания используют прозрачные горшки [2]. В умеренном поясе зеленые корни характерны для некоторых водных растений. Одним из таких растений является водяной орех плавающий (*Trapa natans* L.), у которого имеются специализированные фотосинтезирующие корни [3].

Для большинства растений характерны обычные подземные корни, но в экспериментальных условиях для некоторых из них удается получить хлорофилл-содержащие зеленые корни. К примеру, при изучении культур корней шлемника

байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi), возобновленных из искусственных семян, было отмечено формирование хлоропластов в клетках корней, культивируемых в условиях освещения. Авторы полагают, что способность клеток корней, полученных из искусственных семян, к образованию хлоропластов в условиях освещения может при определенных условиях стать предпосылкой к индукции регенерации целого растения краснокнижного шлемника байкальского [4]. Что касается генетически трансформированных корней, то, например, у *Arabidopsis thaliana* L. были получены зеленые корни в результате сверхэкспрессии гена *GLK* (Germinal center kinase-Like Kinase), который усиливает накопление хлоропластов в корнях. Сверхэкспрессия гена *GLK* не только повышала фотосинтетическую активность и стимулировала развитие хлоропластов за счет активации биогенеза тилакоидных мембран, но также индуцировала деление хлоропластов в корнях [5]. К генетически трансформированным корням также относятся волосовидные корни (от англ. hairy roots), получаемые при помощи *Agrobacterium rhizogenes* [6]. Эти генетически трансформированные культуры корней можно культивировать отдельно от побегов, поскольку они характеризуются высокой скоростью роста, генетической стабильностью и могут продуцировать более высокие уровни корневых вторичных метаболитов, чем интактные растения. Поэтому культуры волосовидных корней многих растений перспективны для производства ценных вторичных метаболитов [7].

Внедрение волосовидных корней в биотехнологическое производство сдерживается, в том числе, из-за риска контаминации грибами и бактериями, что связано с использованием богатых углеводами питательных сред, которые к тому же являются весьма дорогостоящими [8]. В том числе, исходя из этих соображений нами ранее были получены хлоропласт-содержащие зеленые волосовидные корни *T. natans* [9]. Индукция зеленых волосовидных корней обнаруживалась и у некоторых видов наземных растений, при условии их выращивания на свету. К примеру, такие культуры зеленых корней были получены для *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin, которые к тому же только на свету были способны к биосинтезу специфичных флавоноидных гликозидов [10]. Судя по нашим предварительным исследованиям, направленным на получение зеленых волосовидных корней, индуцировать их появление удастся в очень редких случаях и только путем специальных манипуляций.

В ходе серии исследований, посвященных индукции органогенеза мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) из каллусной ткани [11], нами были обнаружены несколько спонтанно инду-

цированных зеленых корней, которые в отличие от обычных корней были способны к неограниченному росту в изолированной культуре на безгормональных питательных средах.

Цель работы – проведение морфометрического, микроскопического и биохимического анализа культур зеленых корней мягкой пшеницы. Микроскопический анализ заключался в обнаружении хлоропластов, а биохимический анализ – в изучении активности некоторых компонентов антиоксидантной системы. В производстве условия культивирования культур корней могут варьировать в большей степени, чем в лаборатории. К тому же способность у культур корней к интенсивному росту при норме и устойчивость к абиотическим стрессам часто коррелируют между собой [12]. Поэтому в экспериментах *in vitro* с зелеными корнями мягкой пшеницы был использован также стресс-фактор – засоление.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Морфометрический анализ культур зеленых корней пшеницы при действии NaCl. В ходе предыдущих исследований, посвященных индукции органогенеза в каллусах мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Фишт, полученных из зрелых зародышей [11] изредка образовывались зеленые корни. В ходе этих экспериментальных работ были обнаружены 3 зеленых корня, которые были изолированы от каллуса и культивировались отдельно в чашках Петри на твердых МС-средах (50% концентрация минеральной основы МС-среды, 14 г/л сахарозы, 60 мг/л инозитола, 2 мг/г глицина, 1 мг/л тиамина и 1 мг/л никотиновой кислоты, 7 г/л агара) без добавления регуляторов роста в течение нескольких месяцев. Какие-либо специфичные условия культивирования каллусов для целенаправленной индукции зеленых корней определить не удалось. Они образовывались спонтанно на стандартных питательных средах при нормальных условиях, но очень редко. Зеленые корни по мере роста делили на части и пересаживали на свежую МС-среду один раз в месяц. В итоге от этих трех зеленых корней были получены 17 условных линий, пронумерованных нами от 1 до 17. Таким образом, все эти 17 анализируемых линий происходили от 3 изначально полученных зеленых корней.

Все опыты по морфометрии линий зеленых корней проводили в чашках Петри с агаризованной МС-средой. Анализируемые линии корней культивировали в камере роста KBW-240 (Binder, Германия) при температуре 25°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности ~140 мкмоль/(м²с). Для экспериментов использовали молодые зеленые корни пшеницы, имевшие длину от 1 до 5 см.

Морфометрический анализ заключался в измерении длины корней каждые 7 дней в течение 28 дней культивирования. Всего было проведено 4 измерения. Для создания стрессовых условий опыты проводились в чашках Петри с агаризованной МС-средой, содержащей 100 мМ NaCl. Концентрация NaCl была подобрана в предыдущих опытах с культурами волосовидных корней табака. Данная концентрация NaCl значительно (до 10 раз) замедляла рост и вызывала гибель не более 10% образцов корней после 30 дней культивирования [12]. При нормальных условиях выращивали 9 линий, а при действии засоления – 8 линий. Для каждой линии выборка составляла 3 корня ($n = 3$) с одинаковой изначальной длиной. Обычные корни пшеницы в качестве контроля использовать не удалось, так как они на безгормональных средах после изоляции от каллуса или побега полностью переставали расти ко времени первого измерения (7 дней).

Фиксация и микроскопический анализ зеленых корней пшеницы. Корни пшеницы фиксировали в 4% формалине на фосфатном буфере (рН 7.2) в течение 4 ч при комнатной температуре. Далее их переносили в 30% глицерин, приготовленный на 2% ДМСО, и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Затем корни перекладывали в “просветляющий раствор” для подготовки к просмотру препаратов под микроскопом. Состав “просветляющего раствора”: 3.7 М KI и 12.5 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в 100 мл 2% ДМСО. Далее 35 мл этого раствора смешивали с 65 мл 100% глицерина. Корни пшеницы выдерживали в “просветляющем растворе” не меньше 1.5 ч, после этого готовили временные препараты в 50% глицерине [13].

Препараты корней нарезались на полуавтоматическом криостате Leica CM1520 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Германия). Толщина препаратов составляла 60 мкм для того, чтобы при разрезании корней на криостате был сохранен интактный слой клеток для просмотра на флуоресцентном микроскопе. Фотографировали клетки паренхимы корней в центральной части зоны всасывания. Таким же образом проводили микроскопию зеленых корней водяного ореха и зеленых клубней картофеля, у которых наличие хлоропластов в этих органах хорошо известно. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Biozero VZ-8100 (Keyence, Япония).

Определение содержания хлорофиллов *a* и *b*. Навеску (около 100 мг) измельченных корней помещали в ступку и растирали с небольшим количеством жидкого азота. Полученный гомогенат собирали в пробирку и добавляли 96% этиловый спирт. Полученный экстракт содержит сумму зеленых и желтых пигментов [14]. Для расчета концентраций хлорофиллов *a* и *b* в экстракте определяли его оптическую плот-

ность спектрофотометрически при длинах волн, соответствующих максимумам спектра поглощения исследуемых пигментов в 96% этиловом спирте. Для хлорофилла *a* максимум поглощения находится при $\lambda = 665$ нм, для хлорофилла *b* – при $\lambda = 649$ нм. Концентрацию хлорофиллов *a* (C_a , мг/л) и *b* (C_b , мг/л) рассчитывали по формуле:

$$C_a = 13.70 \times A_{665} - 5.76 \times A_{649},$$

$$C_b = 25.8 \times A_{649} - 7.60 \times A_{665},$$

где A_{665} и A_{649} – оптическая плотность раствора при длинах волн 665 и 649 нм соответственно. Содержание хлорофиллов *a* и *b* выражали в мкг/г сырой массы.

Анализ антиоксидантной системы культур зеленых корней пшеницы. Для проведения анализа стресс-опосредованных изменений антиоксидантной системы культуры зеленых и обычных корней пшеницы выращивали в течение 30 дней в условиях действия 100 мМ NaCl, согласно методу, ранее использованному нами для биохимического анализа волосовидных корней табака [12]. Активность антиоксидантных ферментов и содержание пролина была пересчитана на 1 г сырой массы корней. Все биохимические исследования проводили в 15 повторностях ($n = 15$).

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) применяли метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анион-радикалы [15]. Активность каталазы определяли по скорости деградации молекул перекиси водорода [16]. Количество малонового диальдегида определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [17]. Для определения содержания пролина использовали метод Khedr с соавт. [18]. Экстракцию пероксидазы проводили по Chaouch с соавт. [19], измерение ее активности – по Vindschedler с соавт. [20].

Статистический анализ. Результаты всех исследований представлены в виде гистограмм со средними значениями выборки, бары обозначают стандартную ошибку среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни ($P \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрический анализ культур зеленых корней пшеницы при нормальных условиях и при действии NaCl

На безгормональных питательных средах обычные культуры корней пшеницы росли очень медленно и к 7 суткам переставали расти (рис. 1а). Из-за этого морфометрический анализ культур обычных корней пшеницы провести не удалось. В то же время зеленые корни пшеницы

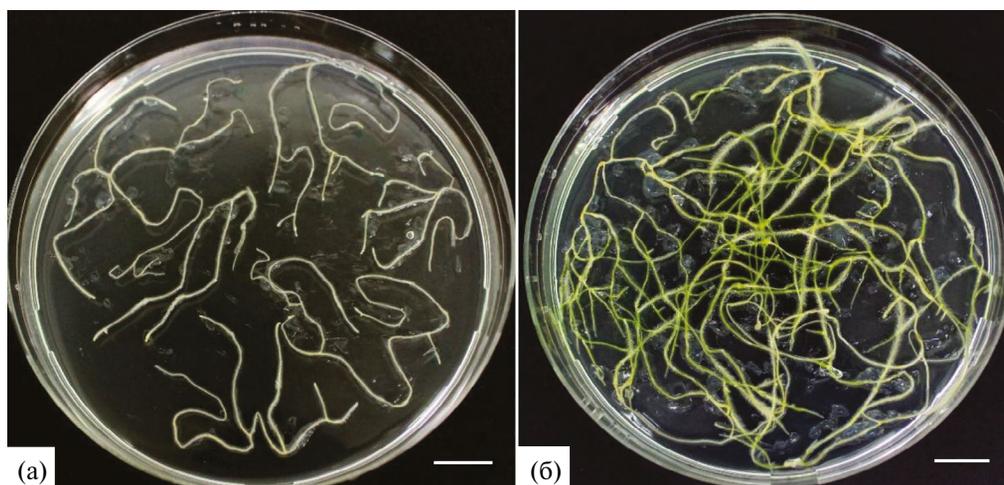


Рис. 1. Внешний вид культур корней мягкой пшеницы, полученных *in vitro*: (а) – обычные корни, (б) – зеленые корни. Масштаб – 1 см.

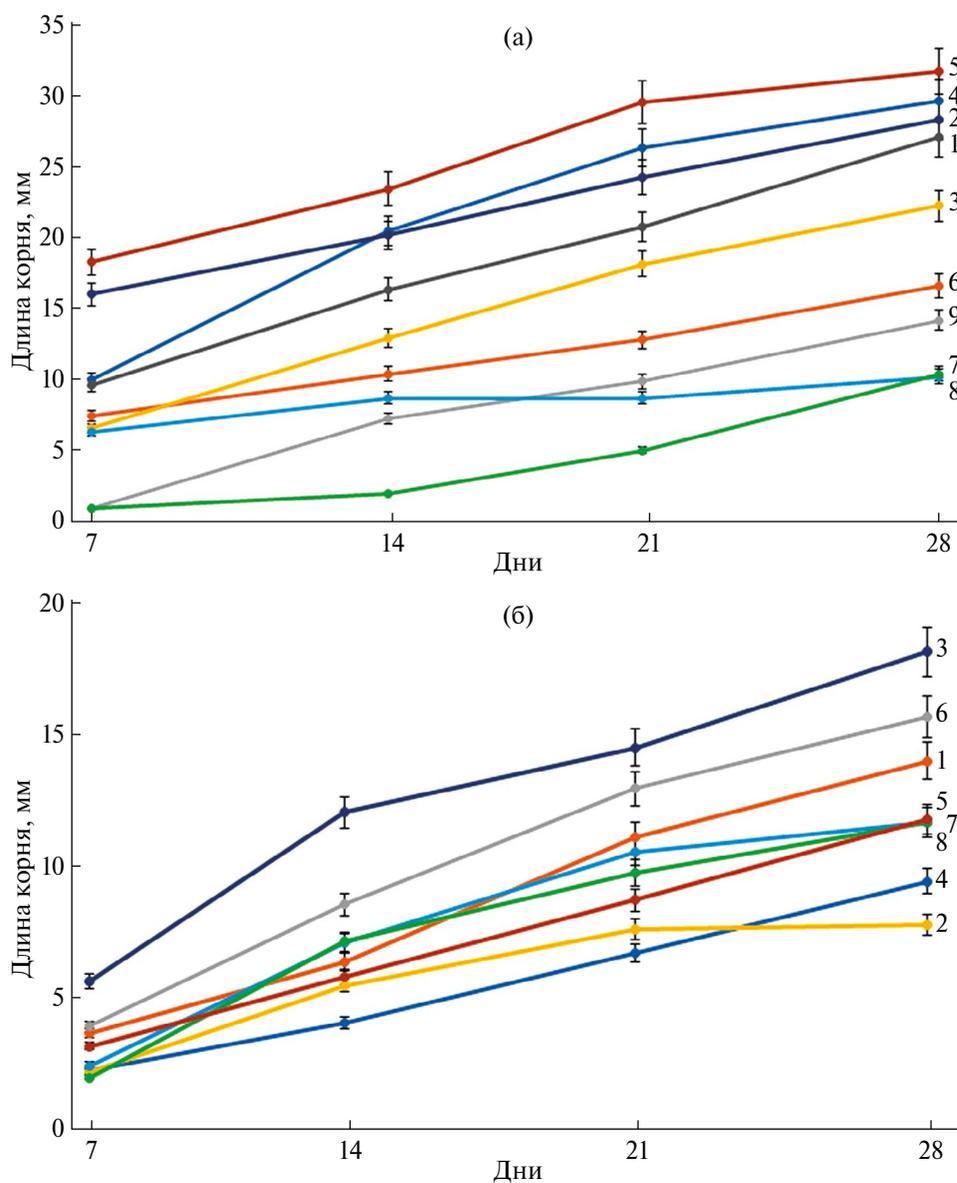


Рис. 2. Длина зеленых корней пшеницы (линии 1–9) при стандартных условиях культивирования (а) и при добавлении в МС-среду 100 мМ NaCl (б).

показывали довольно интенсивный и неограниченный по времени рост (рис. 1б). Рост зеленых корней при засолении замедлился в среднем в 1.5 раза, по сравнению с нормальными условиями (рис. 2). При нормальных условиях наибольшая длина и довольно интенсивный рост был характерен для линий 1, 4 и 5 (рис. 2а). Наибольшая скорость роста обнаруживалась у линий 1, 3, 4 и 9. Медленнее всего при нормальных условиях росли линии 6, 7 и 8 (рис. 2а). При действии NaCl лучше всего росли линии 1, 3 и 6 (рис. 2б). Худшие результаты показали зеленые корни линий 2 и 4 (рис. 2б).

Микроскопический анализ зеленых корней пшеницы

На поперечном срезе (рис. 3а, б) видно, что некоторые паренхимные клетки мезофилла зеленых корней пшеницы содержат довольно большое число хлоропластов. Все эти хлоропласт-содержащие клетки расположены вокруг центрального цилиндра (рис. 3б). К особенностям зеленых корней в отличие от обычных можно отнести наличие очень больших межклетников, рыхлое расположение паренхимных клеток мезофилла и отсутствие жесткой экзодермы (рис. 3а, б). Продольный срез часто приводил к разрушению структуры зеленых корней

с сохранением целостности лишь центрального цилиндра (рис. 3г), тогда как обычные корни пшеницы сохраняли свою структуру (рис. 3в). На рис. 3г хорошо видно, что хлоропласт-содержащие паренхимные клетки расположены в основном вокруг центрального цилиндра, клетки которого, в свою очередь, не содержат хлоропластов, так же, как и расположенные снаружи паренхимные клетки (рис. 3б).

Для зеленых корней была характерна меньшая плотность расположения хлоропластов в клетке, по сравнению с листьями пшеницы (рис. 4а, б), но ввиду больших размеров клеток мезофилла корней на одну клетку приходилось несколько десятков хлоропластов (рис. 3г).

Одним из хорошо известных природных фотосинтезирующих корней являются зеленые корни водяного ореха [9]. Мы приготовили микрофотографии поперечного (рис. 4в) и продольного (рис. 4г) срезов зеленых корней водяного ореха, произрастающих в аквариуме. В данном случае почти все паренхимные клетки мезофилла корней содержали хлоропласты (рис. 4в, г). Хлоропласты не обнаруживались только в клетках центрального цилиндра и экзодермы. Необходимо отметить, что для зеленых корней водяного ореха была характерна четко обособленная и довольно жесткая экзодер-

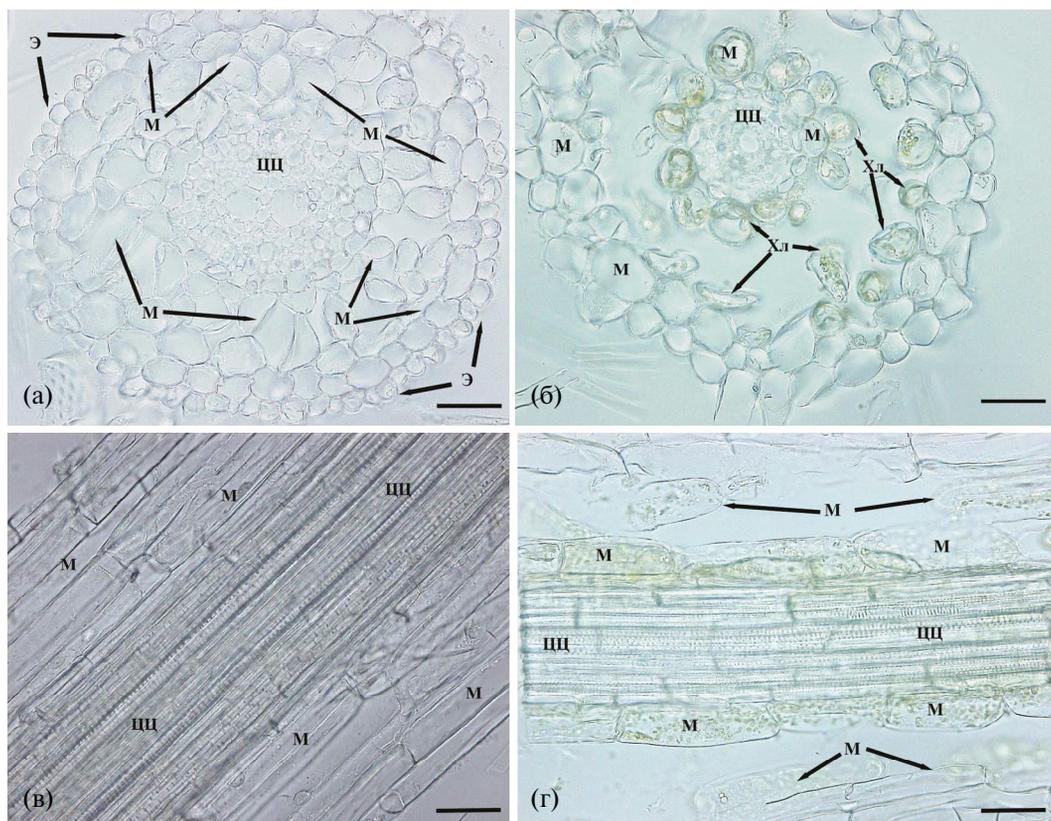


Рис. 3. Поперечный (а, б) и продольный (в, г) срезы обычных (а, в) и зеленых (б, г) корней мягкой пшеницы, растущих в условиях *in vitro*. ЦЦ – центральный цилиндр корня, М – паренхимные клетки мезофилла, Хл – паренхимные клетки корня с хлоропластами, Э – экзодерма. Увеличение $\times 160$. Масштаб – 50 мкм.

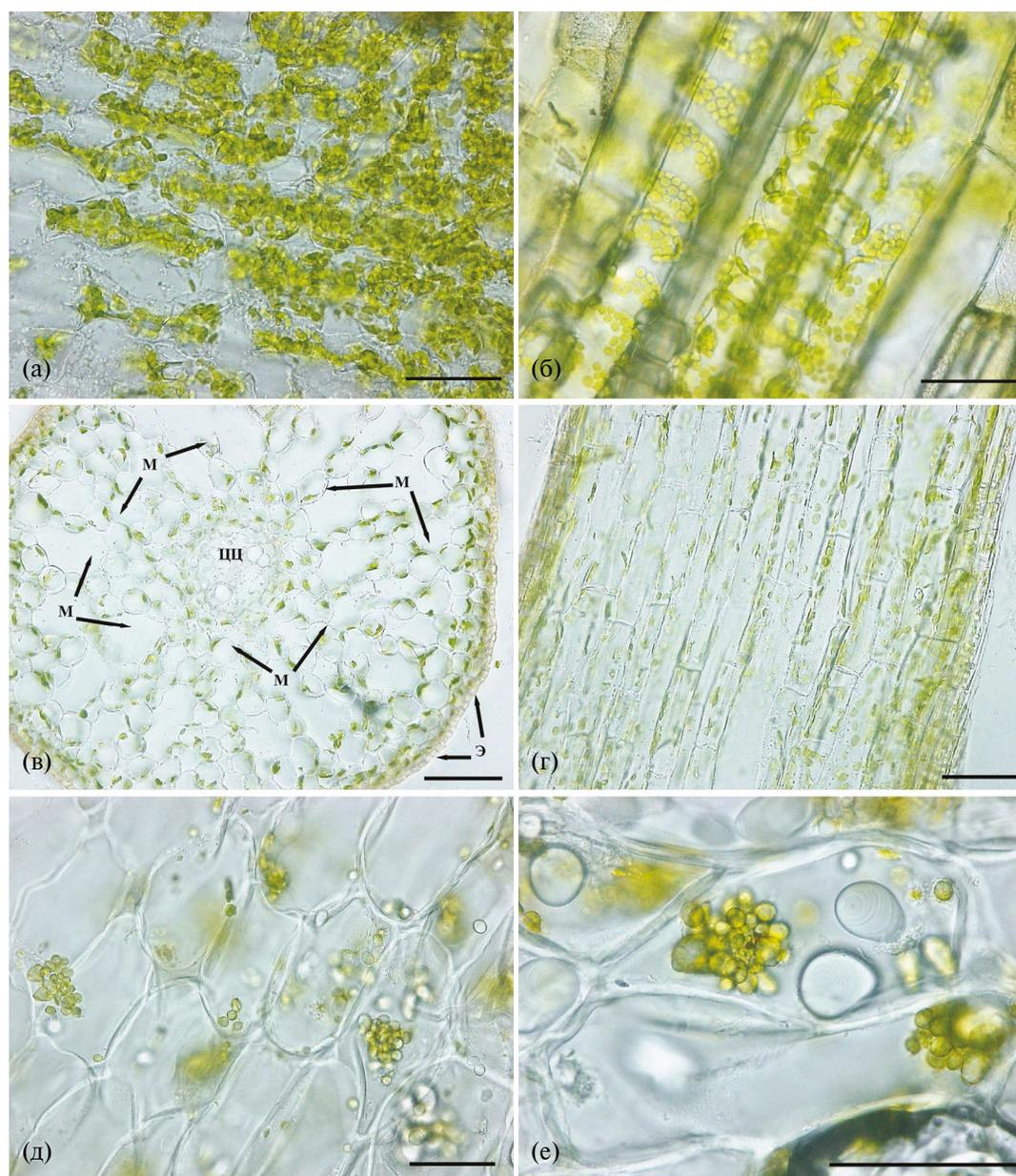


Рис. 4. Поперечный (а, б, в, д, е) и продольный (г) срезы листьев мягкой пшеницы (а, б), зеленых корней водяного ореха (в, г) и позеленевших клубней картофеля (д, е). ЦЦ – центральный цилиндр корня, М – паренхимные клетки мезофилла, Э – экзодерма. Увеличение $\times 160$ (а–д), $\times 320$ (е). Масштаб – 50 мкм.

ма (рис. 4в), в отличие от зеленых корней пшеницы (рис. 3б). Возможно, это связано с тем, что зеленые корни водяного ореха являются специализированным фотосинтезирующим органом и растут в природных условиях [9], тогда как зеленые корни пшеницы индуцируются только в экспериментальных условиях *in vitro*. Еще одним подземным органом, способным к накоплению хлоропластов в клетках, являются клубни картофеля. Мы получили микрофотографии поперечных срезов позеленевших на свету клубней картофеля и также в паренхимных клетках обнаружили хлоропласты (рис. 4д, е). Отличительной особенностью клеток клубней картофеля было то, что хлоропласты в них всегда располагались

компактно, как виноградные грозди, тогда как остальные части клеток были заполнены крахмальными зернами (рис. 4д, е). Таким образом, у зеленых корней пшеницы внутренняя структурная организация была такой же, как у природных зеленых корней водяного ореха.

Содержание хлорофиллов а и b в зеленых корнях пшеницы

Измерение содержания хлорофилла показало, что в зеленых корнях он присутствует (рис. 5). Во всех анализируемых зеленых корнях обнаруживалось примерно одинаковое количество хлорофиллов а и b. Больше всего хлорофилла а было

обнаружено у линии 8, а меньше всего у линии 2. Хлорофилла *b* содержалось больше всего также у линии 8, а меньше всего у линии 4. У линий 1, 4, 5 и 8 было большее содержание хлорофилла *a*, а у линий 2, 3 и 7 было большее содержание хлорофилла *b* (рис. 5).

Анализ антиоксидантной системы зеленых корней пшеницы

При анализе антиоксидантной системы при нормальных условиях было использовано 11 линий зеленых корней и 4 линии обычных корней в качестве контроля. При действии NaCl было использовано 8 линий зеленых корней и 9 линий обычных корней в качестве контроля. При этом номера линий зеленых корней в данном эксперименте совпадают с номерами линий при морфометрическом анализе. Однако эти эксперименты проведены в разное время и число проанализированных линий при нормальных условиях было больше на 2, чем при морфометрическом анализе.

Активность СОД (рис. 6а, б) в среднем у зеленых корней при нормальных условиях была выше в 2 раза, чем при засолении. У обычных корней активность СОД при нормальных условиях была выше, чем при засолении в 6 раз. При нормальных условиях в зеленых корнях активность СОД в среднем была в 2.5 раза выше, чем в контрольных линиях (рис. 6а). При засолении в зеленых корнях активность СОД в среднем также была в 2 раза выше, чем в контрольных линиях (рис. 6б). При нормальных условиях наибольшая активность СОД была характерна для линий зеленых корней 5 и 8, а наименьшая для линии 6 (рис. 6а). При засолении наибольшая активность СОД была обнаружена у линий 3 и 6, а наименьшая для линий 2 и 4 (рис. 6б).

Количество пролина (рис. 6в, г) у зеленых корней при засолении было меньше, чем при нормальных условиях в среднем в 2.5 раза. У обычных корней количество пролина при стрессовых условиях было ниже примерно в 3 раза по сравнению с нормальными условиями. При нормальных условиях в линиях зеленых корней количество пролина в среднем было в 2.5 раза выше, чем в контрольных линиях (рис. 6в). При засолении в линиях зеленых корней количество пролина также в среднем было почти в 3 раза выше, чем в контрольных линиях (рис. 6г). При нормальных условиях наибольшее содержание пролина было характерно для линий зеленых корней 4 и 5, а наименьшее для линии 8 (рис. 6в). При засолении наибольшее содержание пролина было обнаружено у линий 1 и 3, а наименьшее для линий 5 и 6 (рис. 6г).

Активность каталазы (рис. 7а, б) у зеленых корней при нормальных условиях превышала в среднем в 6 раз ее активность при засолении. У обычных корней активность каталазы при нормальных условиях была в среднем больше в 10 раз, чем при засолении. Существенной разницы между обычными и зелеными корнями при нормальных условиях не наблюдалось (рис. 7а). При засолении активность каталазы у зеленых корней была немного выше, чем у обычных корней (рис. 7б). При нормальных условиях наибольшая активность каталазы была характерна для линий зеленых корней 4 и 5, а наименьшая для линий 6 и 7 (рис. 7а). При засолении наибольшая активность каталазы была обнаружена у линий 1, 3 и 6, а наименьшая для линий 2 и 4 зеленых корней (рис. 7б).

Активность пероксидазы (рис. 7в, г) в зеленых корнях при нормальных условиях была выше ее активности при засолении в среднем

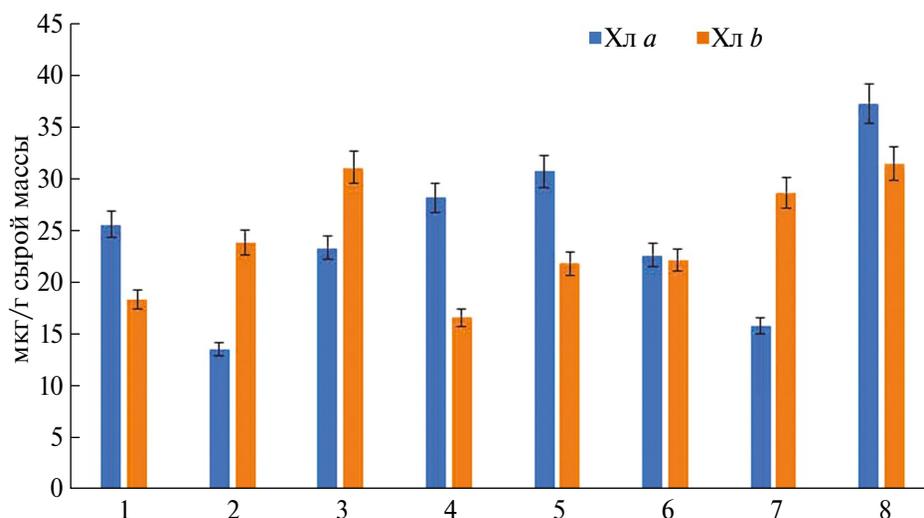


Рис. 5. Содержание хлорофиллов *a* и *b* в зеленых корнях мягкой пшеницы (линии 1–8).

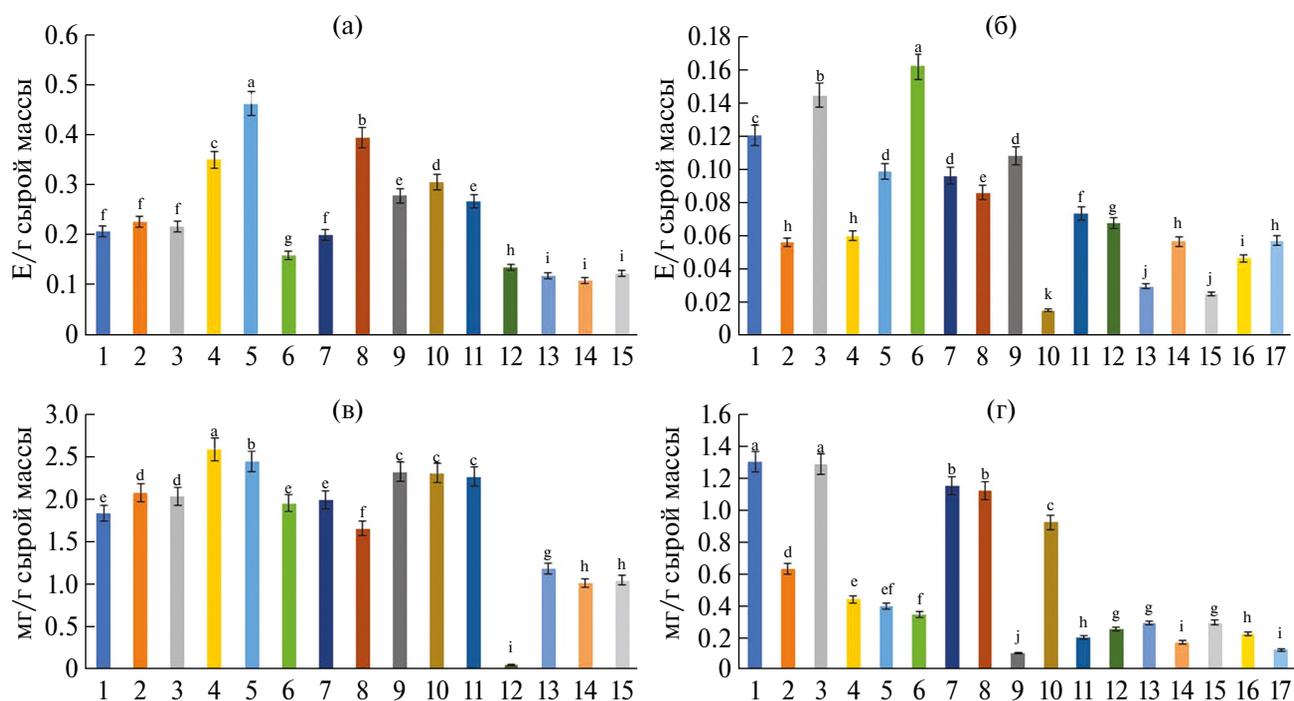


Рис. 6. Активность супероксиддисмутазы (а, б) и содержание пролина (в, г) в корнях пшеницы: а, в – при нормальных условиях (линии зеленых корней – 1–11, линии обычных корней – 12–15); б, г – при добавлении в МС-среду 100 мМ NaCl (линии зеленых корней – 1–8, линии обычных корней – 9–17).

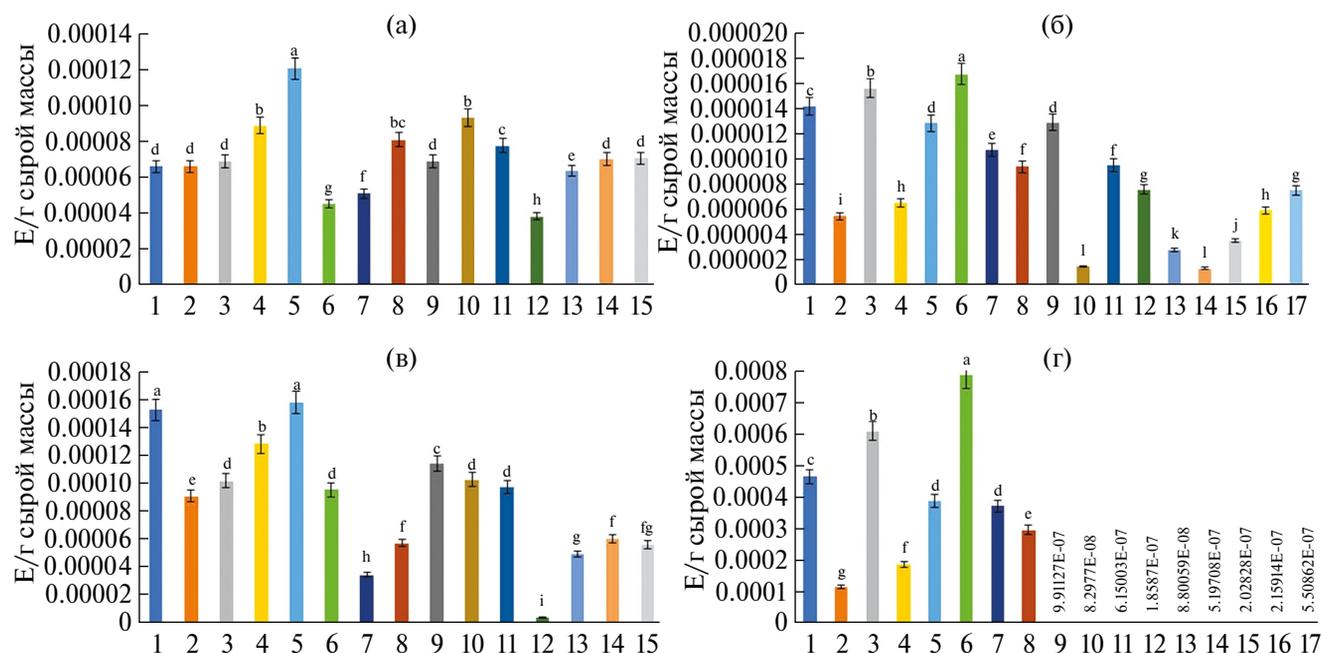


Рис. 7. Активность каталазы (а, б) и пероксидазы (в, г) в корнях пшеницы: а, в – при нормальных условиях (линии зеленых корней – 1–11, линии обычных корней – 12–15); б, г – при добавлении в МС-среду 100 мМ NaCl (линии зеленых корней – 1–8, линии обычных корней – 9–17).

в 2.5 раза. При засолении у обычных корней активность пероксидазы была очень низкой (рис. 7г). При нормальных условиях в линиях зеленых корней активность пероксидазы в среднем была в 2.5 раза выше, чем в контрольных линиях. При нормальных условиях наибольшая

активность пероксидазы была характерна для линий зеленых корней 1 и 5, а наименьшая для линий 7 и 8 (рис. 7в). При засолении наибольшая активность пероксидазы была обнаружена у линий 3 и 6, а наименьшая для линий 2 и 4 зеленых корней (рис. 7г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Волосовидные корни растений, полученные путем генетической трансформации с *A. rhizogenes* характеризуются высокими темпами роста на безгормональных питательных средах [7, 21]. Такие способные к изолированному росту культуры корней находят применение не только в качестве продуцентов корневых вторичных метаболитов, но и в фундаментальных исследованиях [12]. В более ранних исследованиях нам не удалось получить волосовидные корни мягкой пшеницы [22]. О создании волосовидных корней мягкой пшеницы другими авторами также не сообщалось, хотя генетическая трансформация злаковых при помощи *A. rhizogenes* все же возможна и может приводить к индукции таких корней [23]. В ходе морфометрического анализа выяснилось, что изолированные культуры корней мягкой пшеницы на питательных средах без добавления регуляторов роста ауксиновой природы не растут. В этой связи обнаруженные нами зеленые корни могут стать альтернативой истинным волосовидным корням, которые довольно трудно получить у однодольных. При этом культуры зеленых корней мягкой пшеницы все же растут намного медленнее, чем типичные волосовидные корни двудольных. К примеру, при нормальных условиях волосовидные корни табака росли в 3-8 раза быстрее зеленых корней мягкой пшеницы [12]. При действии 100 мМ NaCl темпы роста зеленых корней мягкой пшеницы падали примерно в 2 раза, похожие результаты нами были получены и для волосовидных корней [12]. Обычные корни мягкой пшеницы при нормальных условиях показывали очень низкие темпы роста, причем только в течение нескольких дней после их пересадки, далее они полностью переставали расти и через 1 месяц культивации обычно погибали.

Как и предполагалось, микроскопический анализ зеленых корней показал наличие в их клетках хлоропластов (рис. 3б, г). Хлоропласты обнаруживались только в паренхимных клетках корня, также как и у природных фотосинтезирующих корней водяного ореха (рис. 4в, г). В наружных клетках экзодермы и в клетках центрального цилиндра как у зеленых корней мягкой пшеницы, так и в фотосинтезирующих корнях водяного ореха хлоропластов не было. Отличительной чертой зеленых корней водяного ореха была четко выделяемая и жесткая экзодерма (рис. 4в), что может быть связано с тем, что у данного растения такие корни – природная особенность и росло оно не в условиях *in vitro*, а в обычном аквариуме. С другой стороны, у обычных корней мягкой пшеницы, росших в условиях *in vitro*, экзодерма также четко выделялась (рис. 3а). Таким образом, для зеленых

корней мягкой пшеницы были обнаружены ряд нарушений гистологической структуры корня, такие как большие размеры межклетников, отсутствие четко выделяемой экзодермы, что подтверждает мысль о том, что зеленые корни мягкой пшеницы это не норма, а феномен, изредка возникающий в условиях *in vitro*. С другой стороны, зеленые корни в целом все же имели типичное гистологическое строение корней и по локализации хлоропласт-содержащих клеток были схожи с природными фотосинтезирующими корнями водяного ореха. Также необходимо отметить, что, по нашим наблюдениям, ни волосовидные, ни обычные корни многих растений в культуре *in vitro* не зеленеют даже при выращивании в условиях интенсивного света. Это говорит об особенностях корней мягкой пшеницы, у которых, видимо, возможность индукции хлоропластов все же заложена природой этого вида.

Дополнительным доказательством наличия фотосинтеза в зеленых корнях стало выявление в них пигментов – хлорофиллов *a* и *b*. Корреляции между содержанием хлорофилла и результатами морфометрического анализа не обнаруживались. В целом все проанализированные линии зеленых корней пшеницы были близки по содержанию обеих форм хлорофилла (рис. 5). Содержание хлорофилла *a* в листьях мягкой пшеницы составляет порядка 2 мг/г сырой массы, а хлорофилла *b* – 0.5 мг/г сырой массы [24]. В зеленых корнях же обнаруживалось намного меньше хлорофилла *a* (примерно в 80 раз) и хлорофилла *b* (примерно в 20 раз). Таким образом, содержание хлорофилла в зеленых корнях было в десятки раз меньше, чем в листьях. В связи с этим, можно полагать, что и эффективность фотосинтеза в зеленых корнях была намного ниже, чем в листьях. Основным отличием зеленых корней было высокое значение соотношения хлорофилла *b* к хлорофиллу *a* – в среднем 1 : 1, тогда как в листьях пшеницы оно в среднем составляло 1 : 4 [24]. Сообщалось, что содержание хлорофилла *b* увеличивается в условиях недостатка освещения [25], что может способствовать увеличению эффективности фотосинтеза в таких условиях [26]. Но в работе использовалась стандартная камера KBW-240 (Binder, Германия) с лампами дневного света, обеспечивающими освещенность ~140 мкмоль/(м² с), что вполне достаточно для мягкой пшеницы [27]. В то же время высокая величина соотношения хлорофиллов *a/b* часто служит признаком высокой потенциальной интенсивности фотосинтеза [28], что характерно для листьев, а не зеленых корней пшеницы. Таким образом, зеленые корни – это несбалансированная система с низкой эффективностью фотосинтеза, по

сравнению со специализированным органом — листьями.

Ввиду отсутствия настоящих волосовидных корней пшеницы, при анализе антиоксидантной системы можно привести сравнение зеленых корней пшеницы с волосовидными корнями табака из нашей предыдущей работы [12]. При действии NaCl активность СОД в волосовидных корнях табака оставалась примерно такой же, как при норме [12]. У зеленых корней пшеницы при нормальных условиях наблюдали примерно такой же уровень активности СОД, а при засолении активность СОД падала в среднем в 2 раза (рис. 6а, б). У обычных корней пшеницы активность СОД была ниже, чем у волосовидных корней табака и зеленых корней пшеницы. Что касается пролина, то его содержание у волосовидных корней при засолении увеличивалось [12], тогда как у зеленых корней его содержание в этих же условиях снижалось (рис. 6в, г). Интересно то, что изначальное количество пролина при норме в зеленых и волосовидных корнях было сопоставимо. У зеленых корней пшеницы в отличие от волосовидных корней табака при засолении также уменьшалась каталазная активность (рис. 7а, б). У волосовидных корней табака при засолении каталазная активность повышалась [12]. Таким образом, основным отличием зеленых корней пшеницы от волосовидных корней табака при засолении было наличие негативных изменений в компонентах антиоксидантной системы. Еще более существенные негативные изменения в компонентах антиоксидантной системы обнаруживались у обычных корней пшеницы при засолении. При нормальных условиях наиболее высокие уровни пролина и активностей СОД, каталазы и пероксидазы были характерны для линий 4 и 5 (рис. 6, 7). Необходимо отметить, что именно эти две линии демонстрировали наиболее высокие темпы роста при норме (рис. 2а). При действии NaCl наиболее высокие уровни пролина и активностей антиоксидантных ферментов были характерны для линий 1, 3 и 6 (рис. 6, 7). Эти же линии наиболее быстро росли в условиях засоления (рис. 2б). Исходя из этих данных можно говорить о том, что зеленые корни пшеницы и волосовидные корни табака с позитивными параметрами компонентов антиоксидантной системы чаще всего также характеризуются и более высокими параметрами роста на культуральной среде как при норме, так и при действии NaCl. Очень низкие уровни активности пероксидазы у обычных корней пшеницы при засолении сопровождалось отсутствием роста и их гибелью в стрессовых условиях.

Можно предположить, что наличие фотосинтеза обеспечивает корни пшеницы мини-

мально необходимыми для роста в изолированной культуре фитогормонами. Действительно, рост волосовидных корней в изолированной культуре обеспечивается за счет влияния на цитокининовый и ауксиновый сигналинги [29]. Хорошо известно, что хлоропласты не только обеспечивают фотосинтез, но и биосинтез ауксинов и цитокининов [30]. С другой стороны, сами эти два фитогормона способствуют усилению фотосинтеза [31]. Таким образом, в зеленых корнях вероятнее всего накапливается больше фитогормонов, чем в обычных корнях пшеницы, что и позволяет им расти неограниченно на безгормональных питательных средах.

В результате работы нами получены зеленые корни мягкой пшеницы, способные к неограниченному росту на безгормональных питательных средах в изолированной культуре, в том числе в условиях засоления. В зеленых корнях мягкой пшеницы обнаружены хлоропласты и пигмент хлорофилл, что свидетельствует о том, что в них происходит процесс фотосинтеза. Зеленые корни характеризовались большим содержанием пролина и более высокой активностью супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы, чем обычные корни пшеницы как при норме, так и при засолении. Зеленые корни могут стать альтернативой волосовидным корням, которые очень трудно получить у злаковых, для их использования как в фундаментальных исследованиях, так и в прикладных целях.

Исследования Александровой В.М., Мусина Х.Г. и Бережневой З.А. выполнены в рамках государственного задания № 122030200143-8. Работы Галимовой А.А. и Кулуева Б.Р. поддержаны грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sheeran L., Rasmussen A. Aerial roots elevate indoor plant health: physiological and morphological responses of three high-humidity adapted Araceae species to indoor humidity levels // *Plant Cell Environ.* 2023. V. 46. P. 1873. <https://doi.org/10.1111/pce.14568>
2. Коломейцева Г.Л. Орхидеи и особенности их выращивания. М.: ООО "Фитон XXI". 2020. 264 с.
3. Кулуев Б.Р., Артюхин А.Е., Шевченко А.М., Михайлова Е.В. Водяной орех плавающий *Trapa L.*: био-

- логия, ареал распространения и исследование его изолированных популяций в озерах Нуримановского района Республики Башкортостан // Биомика. 2017. Т. 9. № 2. С. 101.
4. *Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.* “Искусственные семена” как способ получения экологически чистого лекарственного сырья и сохранения исчезающих видов растений // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2011. № 2. С. 4.
 5. *Kobayashi K., Sasaki D., Noguchi K., Fujinuma D., Komatsu H., Kobayashi M., Sato M., Toyooka K., Sugimoto K., Niyogi K.K., Wada H., Masuda T.* Photosynthesis of root chloroplasts developed in Arabidopsis lines overexpressing GOLDEN2-LIKE transcription factors // *Plant Cell Physiol.* 2013. V. 54. P. 1365. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct086>
 6. *Kuzovkina I.N., Vdovitchenko M.Y.* Genetically transformed roots as a model system for studying physiological and biochemical processes in intact roots // *Russ. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. P. 941. <https://doi.org/10.1134/S1021443711050141>
 7. *Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев А.Х., Чумаков М.И., Баймиев А.Х., Чемерис А.В.* “Косматые” корни растений – важный инструментальный для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производственников // Биомика. 2015. № 2. С. 70.
 8. *Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р., Якупова А.Б., Сагитов А.М., Чемерис А.В.* Рост культур бородачатых корней в колбах и прототипах биореакторов дождевального типа // Естественные и технические науки. 2020. № 4. С. 19.
 9. *Mikhaylova E., Artyukhin A., Musin Kh., Panfilova M., Gumerova G., Kuluev B.* The first report on the induction of hairy roots in *Trapa natans*, a unique aquatic plant with photosynthesizing roots // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2021. V. 144. P. 485. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01963-7>
 10. *Skala E., Kicel A., Olszewska M.A., Kiss A.K., Wysokińska H.* Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives // *Biomed Res. Int.* 2015. Article ID 181098. <https://doi.org/10.1155/2015/181098>
 11. *Гумерова Г.Р., Галимова А.А., Кулуев Б.Р.* Каллусообразование и органогенез мягкой пшеницы с использованием зрелых зародышей в качестве эксплантов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2023. Т. 184. № 2. С. 19. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-2-19-28>
 12. *Musin Kh.G., Gumerova G.R., Vaimukhametova E.A., Kuluev B.R.* Growth and stress resistance of tobacco hairy roots with constitutive expression of *ARGOS-LIKE* gene // *Russ. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69: 92. <https://doi.org/10.1134/S1021443722050156>
 13. *Filin A.N., Ivanov V.B.* Effect of 2,4-D on cell proliferation and elongation in the roots of *Arabidopsis thaliana* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 166. <https://doi.org/10.1134/S1021443716010064>
 14. *Шлык А.А.* Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О.А. Павлиновой. М. Наука. 1971. С. 154.
 15. *Чевари С., Чаба И., Секей И.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985. № 11. С. 678.
 16. *Panchuck I.I., Volkov R.A., Schoff F.* Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 838. <https://doi.org/10.1104/pp.001362>
 17. *Taylor N.L., Millar A.H.* Oxidative stress and plant mitochondria // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 372. P. 389. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_28
 18. *Khedr A.H.A., Abbas M.A., Abdel W.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M.* Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
 19. *Chaouch S., Queval G., Vanderauwera S., Mhamdi A., Vandorpe M., Langlois-Meurinne M., Breusegem F., Saindrenan P., Noctor G.* Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE1 in a daylength-related manner // *Plant Physiol.* 2010. V. 153. P. 1692. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153957>
 20. *Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerish C., Davies D.R., Bolwell G.P.* Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // *New Phytol.* 2001. V. 151. P. 185. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x>
 21. *Katuri S.R., Khanna R.* Kinetic growth model for hairy root cultures // *Math. Biosci. Eng.* 2019. V. 16. P. 553. <https://doi.org/10.3934/mbe.2019027>
 22. *Гумерова Г.Р., Кулуев Б.Р., Кагирова А.С., Вершинина З.Р., Чемерис А.В.* Биобаллистическая трансформация *Triticum aestivum* rol-генами *Agrobacterium rhizogenes* // Биомика. 2017. Т. 9. № 4. С. 317.
 23. *Runo S., Macharia S., Alakonya A., Machuka J., Sinha N., Scholes J.* Striga parasitizes transgenic hairy roots of *Zea mays* and provides a tool for studying plant-plant interactions // *Plant Methods.* 2012. V. 8: 20. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-20>
 24. *Лиховидова В.А., Газе В.Л., Ионова Е.В.* Влияние фотосинтетического пигмента хлорофилла при различной влагообеспеченности на продуктивность растений озимой мягкой пшеницы // Аграрная наука. 2020. Т. 340. № 7. С. 86. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-340-7-86-89>
 25. *Boardman N.K.* Comparative photosynthesis of sun and shade plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1977. V. 28. P. 355.
 26. *Osmond C., Lange L., Nobel P.* Physiological plant ecology I: responses to the physical environment. Springer-Verlag. 1981. V. 12A. P. 67.

27. Okuda T., Matsuda Y., Yamanaka A., Sagisaka S. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment // *Plant Physiol.* 1991. V. 97. P. 1265. <https://doi.org/10.1104/pp.97.3.1265>.
28. Николаевский В.С. Биологические основы газоустойчивости растений. Новосибирск: Наука, 1979. 278 с.
29. Швец Д.Ю., Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Баймухаметова Э.А., Кулуев Б.Р. *rol*-гены агробактерий: возможные биологические функции // *Успехи современной биологии.* 2023. Т. 143. № 5. С. 487. <https://doi.org/10.31857/S004213242305006X>
30. Cackett L., Luginbuehl L.H., Schreier T.B., Lopez-Juez E., Hibberd J.M. Chloroplast development in green plant tissues: the interplay between light, hormone, and transcriptional regulation // *New Phytol.* 2022. V. 233. P. 2000. <https://doi.org/10.1111/nph.17839>
31. Müller M., Munné-Bosch S. Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants // *Plant Physiol.* 2021. V. 185. P. 1500. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa119>

УДК 581.1:57.085.23

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И НАКОПЛЕНИЯ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ ЛАВАНДЫ УЗКОЛИСТНОЙ (*Lavandula angustifolia* MILL.)

© 2024 г. П. А. Иванов^а, В. А. Хабаров^а, Д. А. Некрасова^а,
Н. С. Пивоварова^а, А. К. Уэйли^а, М. Н. Пovyдыш^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет”
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
*e-mail: maria.povydysh@pharminnotech.com

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 05.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Определены ростовые характеристики и компонентный состав полифенольных соединений каллусных культур клеток лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.), выращенных на питательных средах различного состава. Одним из продуктивных биотехнологических подходов к регуляции синтеза вторичных метаболитов является добавление в питательную среду фитогормонов. Было установлено, что на накопление фенольных соединений (фенольных кислот, флавоноидов, антоцианов) может положительно влиять присутствие α -нафтилуксусной кислоты (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 6-бензиламинопурина (БАП) и кинетина. Для каждой питательной среды были построены кривые роста и рассчитаны ростовые параметры. Анализ, проведенный с использованием методов обратнофазной ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрической детекцией, позволил выявить во всех образцах каллусных культур лаванды розмариновую кислоту в качестве мажорного соединения. Выявлены закономерности накопления розмариновой кислоты под влиянием таких факторов, как освещенность и состав питательной среды. Из четырех исследованных сред наиболее высокие значения ростовых параметров и содержания розмариновой кислоты ($1.26 \pm 0.13\%$) были получены на среде, содержащей 2.0 мг/л α -НУК и 0.1 мг/л БАП.

Ключевые слова: *Lavandula angustifolia* Mill., вторичные метаболиты, розмариновая кислота, *in vitro*

DOI: 10.31857/S0015330324030061, EDN: NMKWNУ

ВВЕДЕНИЕ

Культуры лекарственных растений *in vitro*, в том числе каллусные культуры, не нашли широкого применения в фармацевтической индустрии (за исключением немногих успешных проектов [1]). Это может объясняться трудоемкостью масштабирования (трансфера) технологии из лаборатории в производство, высокой затратностью производства, сложностью стандартизации культур из-за разнородности содержания синтезируемых вторичных метаболитов, возможностью синтеза минорных веществ, присутствующих в интактных растениях в следовых количествах. Последняя из вышеуказанных причин не всегда является недостатком, так как при подборе определенных условий в культурах *in vitro* может быть достигнуто избирательное накопление биологически активных веществ (БАВ). Помимо этого, культивирование *in vitro* дает возможность строго контролировать и регламентировать процесс выращивания и содер-

жание вторичных метаболитов в получаемых продуктах. Несмотря на ограничения промышленного использования, различные культуры растений *in vitro* нашли применение в косметологии и производстве биологически активных добавок (БАД) [2].

Лаванда узколистная (*Lavandula angustifolia* Mill.) из сем. *Lamiaceae* – эфиромасличная культура, широко используемая в косметологии и парфюмерии. Состав эфирного масла лаванды узколистной хорошо изучен [3, 4]. В нем преобладают линалилацетат, 1,8-цинеол, линалоол, α -терпинеол, лимонен, камфора. Среди полифенольных соединений в надземной части лаванды обнаружены фенольные кислоты (розмариновая, феруловая, галловая, хлорогеновая, эллаговая и кофейная кислоты) и флавоноиды (в основном, производные апигенина, лютеолина и кверцетина, кумарины и танины) [5, 6]. Надземная часть, цветки и эфирное масло лаванды обладают противогрибковым, антибак-

териальным, неврологическим, противомикробным, антипаразитарным, антидиабетическим и обезболивающим действием [7–9]. Комплекс полифенольных соединений обладает выраженной способностью к подавлению свободных радикалов; наибольшую активность проявляют розмариновая и изосальвианоловая кислоты, лавандуфурандиол и лавандуфлюорен [10]. Перечень лекарственных средств на основе сырья лаванды ограничен. Сырье лаванды входит в состав ряда БАД седативного (“Кармолис®” – капли для приема внутрь, “Лаванда-антистресс, капсулы” (ЗАО “Эвалар”), “Олеокапс № 7” (ООО “Русбио”) и др.), мочегонного, противосудорожного, спазмолитического действия (“Лаванды цветки и трава” (ООО “Компания Хорст”) и др.).

Естественный ареал лаванды узколистной охватывает горные районы Средиземноморья от Испании до Франции и Италии. Несмотря на высокую приспособленность лаванды к различным климатическим условиям, в России территории, пригодные для ее выращивания в промышленных масштабах, расположены на Крымском полуострове и в некоторых районах Краснодарского края.

Ценность сырья лаванды узколистной наряду с трудностями выращивания на территории РФ требует внедрения эффективных методов культивирования *in vitro*, в том числе для производства ценных вторичных метаболитов. Наиболее изучены возможности клонального микроразмножения лаванды [11], тогда как каллусные культуры исследовались, главным образом, с точки зрения ростовых характеристик и способности к органогенезу [12]. Представляется целесообразным оценить химический состав каллусных культур и оптимизация условий культивирования для достижения максимального выхода БАВ.

Цель работы – исследование особенностей роста, качественная и количественная оценка вторичных метаболитов фенольной природы, оптимизация условий культивирования каллусных культур *Lavandula angustifolia* для достижения максимального выхода БАВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе лаборатории культур растительных клеток ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет” (СПХФУ) Минздрава России в 2022 – 2023 г.

Введение в культуру *in vitro*. В качестве объектов исследования использованы каллусные культуры лаванды узколистной, полученные в 2021 г. [13]. Растительный материал для введения в культуру *in vitro* получали в питомнике лекарственных растений СПХФУ (пос. Лемболово, Ленинградская область).

Питательную среду готовили по прописи Мурасиге-Скуга (MS) [14] с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (α -НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 6-бензиламинопурина (БАП) и кинетина. В большинстве работ, посвященных оптимизации каллусогенеза представителей семейства *Lamiaceae* и, в частности, лаванды узколистной [15, 16], среди цитокининов отдается предпочтение БАП. В 2015 г. Nishikawa с соавт. [17] провели сравнительный анализ различных сочетаний индолилуксусной кислоты (ИУК), 2,4-Д, кинетина и БАП для каллусных культур *L. angustifolia*. Наилучшие результаты достигались на средах, дополненных 2 мг/л БАП и 2 мг/л 2,4-Д. Кинетин, в свою очередь, показывал посредственные результаты, в особенности при культивировании на свету и в сочетании с 2,4-Д. На основании литературных данных были предложены сочетания гормонов, приведенные в таблице. 1.

Таблица 1. Составы и условные обозначения питательных сред, используемых для культивирования каллусных культур *Lavandula angustifolia*

Условное обозначение	Содержание фитогормонов	
К (контроль)	α -НУК (2.0 мг/л)	Кинетин (0.001 мг/л)
2Д	2,4-Д (2.0 мг/л)	БАП (2.0 мг/л)
1Н	α -НУК (1.0 мг/л)	БАП (0.5 мг/л)
2Н	α -НУК (2.0 мг/л)	БАП (0.1 мг/л)

Культивирование осуществляли в сосудах объемом 250 мл (объем питательной среды составлял 50 ± 5 мл), закрытых ватно-марлевой пробкой и бумагой, при температуре 25°C и влажности воздуха, равной 60–70%, для предотвращения испарения влаги из питательной среды и усыхания культур. Культивирование проводили параллельно в темноте (т) и на свету (с), с соблюдением фотопериода длительностью в 16 ч. Освещенность в световой комнате была равна 10000 Лк. [18]. Пересадку культур осуществляли в ламинар-боксе в помещении класса С, квалифицированного по стандартам GMP. Цикл субкультивирования составлял 21 сут.

Определение жизнеспособности клеток. До начала цикла культивирования часть культуры, предназначенной для пассажа, брали для микроскопического анализа. В качестве витального красителя использовали нейтральный красный. Микрофотографии клеток получены с помощью цифровой камеры Bresser LCD 50x-2000x

(“Bresser”, Германия) с применением техники “давленный” препарат при увеличении $\times 200$.

Определение ростовых параметров. Предварительно взвешенные при пересадке культуры принимали за начальную массу (m_0), по достижении заданной временной точки вновь измеряли массу культуры (m_1). Все измерения проводили на сырой вес.

Индекс роста определяли по формуле:

$$I = \frac{m_{max} - m_0}{m_0}, \text{ где:}$$

m_{max} – масса культуры в фазе максимального прироста (г);

m_0 – начальная масса (г).

Удельную скорость роста в экспоненциальной фазе (μ) определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln m_2 - \ln m_1}{t_2 - t_1}, \text{ где:}$$

μ – удельная скорость роста, сут.⁻¹;

$\ln m_2$ и $\ln m_1$ – логарифмические индексы роста массы культуры в конечный и начальный момент экспоненциальной фазы, соответственно (с учетом того, что различием между начальными массами можно в данном случае пренебречь);

t_2 и t_1 – время начала и конца экспоненциальной фазы роста;

m_2 и m_1 – масса в конце и в начале экспоненциальной фазы.

Определение границ фаз производили по кривой роста в полулогарифме.

Время удвоения биомассы (τ) рассчитывали по формуле:

$$\tau = \frac{\ln 2}{\mu}, \text{ где:}$$

τ – время удвоения биомассы, сут.;

μ – удельная скорость роста, сут.⁻¹.

Фитохимический анализ. Каллусные культуры высушивали в потоке воздуха (40°C) в сушильном бытовом шкафу СП-100 (“Нефтехимгруп”, Россия) и измельчали. Высушенную биомассу хранили в пенициллиновых флаконах при комнатной температуре в сухом темном месте. Для сравнительного фитохимического анализа использовали лекарственное растительное сырье (ЛРС) – высушенные и измельченные цветки и листья лаванды узколистной (производитель ООО “Хорст”, Россия).

Качественный анализ групп БАВ проводили с помощью общепринятых фитохимических методов, рекомендованных Государственной фармакопеей РФ [19].

Для определения компонентного состава каллусной культуры методом ВЭЖХ использовали извлечения, полученные с помощью 96% этилового спирта методом экстракции на водяной бане в течение 5 мин при соотношении

сырье : экстрагент 1 : 4. Аналитическая хроматографическая система состояла из жидкостного хроматографа Shimadzu prominence LC-20AD, оснащенного автосамплером Shimadzu Prominence SIL-20A (“Shimadzu”, Япония), колонкой Supelcosil LC-18 25 см \times 4.6 мм, 5 мкм (“Sigma-Aldrich”, США) и диодно-матричным детектором Shimadzu Prominence SPD-M20A (“Shimadzu”, Япония). Система подвижной фазы состояла из элюента А – воды ультрачистой, полученной с использованием системы arium® mini (“Sartorius”, Германия) с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты (ТФУ) (v/v) (“PanReac AppliChem”, Германия), и элюента Б – ацетонитрила HPLC Far UV/Gradient Grade (“J.T. Baker”, США) с добавлением 0.1% ТФУ.

Профиль элюции: 0.01–5.0 мин 5% Б (изократический режим), 5.0–45.75 мин 5–100% Б (линейный градиент), 45.75–50.0 мин 100% Б (изократический режим), 50.0–60.0 мин 100–5% Б (линейный градиент), 60.0–65.0 мин 5% Б (изократический режим, приведение колонки в равновесие). Ввод анализируемого образца осуществляли в объеме 10 мкл, температура колонки во время анализа составляла 40°C, используемая скорость потока 1 мл/мин. Запись УФ-спектра осуществляли в диапазоне от 100 до 400 нм, аналитические длины волн – 235, 254, 280 и 340 нм.

Для определения суммы фенольных соединений (ФС) использовали методику по определению ФС в микрообъемах, основанную на реактиве Фолина–Чокальтеу [20]. Измельченные пробы сырья массой 0.05 г растирали с 1.5 мл 96% этанола в пробирках типа Эппендорф, экстрагировали в течение 45 мин при температуре 45°C с периодическим перемешиванием (каждые 15 мин) и центрифугировали в течение двух минут при частоте вращения 16000 об/мин.

Из полученных экстрактов отбирали образцы по 0.075 мл, к каждому образцу добавляли по 0.075 мл реактива Фолина–Чокальтеу, разбавленного в 5 раз, перемешивали, через 3 мин добавляли по 0.15 мл 20% раствора натрия углекислого и по 1.2 мл дистиллированной воды, перемешивали и оставляли при комнатной температуре. Через 1 ч измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 725 нм против холостого опыта. Длина оптического пути – 1 см.

Суммарное количество ФС, содержащееся в 1 г сырья, рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{D \cdot V}{K \cdot M \cdot 1000}, \text{ где}$$

C – суммарное количество ФС в мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы сырья;

D – оптическая плотность раствора при 725 нм;

K – тангенс угла наклона калибровочной кривой;

V – объем экстракта, мл;

M – масса сырья, г.

Для количественного ВЭЖХ-анализа использовали высушенные цветки *L. angustifolia* и каллусную культуру, выращенную на среде 2Н. Сырье измельчали, просеивали сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Точную навеску сырья подвергали экстракции спиртом этиловым 96% в соотношении сырье (г): экстрагент (мл), равном 4.0 : 100 (1 : 20). Экстракцию проводили на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин с момента закипания растворителя. Полученные экстракты охлаждали, фильтровали и доводили спиртом до 100 мл. Полученные растворы анализировали ранее описанным ВЭЖХ-методом. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Содержание розмариновой кислоты в исследуемых образцах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C' \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W) \cdot 1000}, \text{ где:}$$

X – содержание розмариновой кислоты в растительном сырье, %;

C' – концентрация розмариновой кислоты в извлечении, мг/мл;

V – объем экстрагента, используемого для приготовления экстракта, мл;

m – масса навески сырья, г;

W – влажность растительного сырья, %.

Обработка данных. Исследование ростовых параметров культуры клеток и содержания в ней фенольных соединений проводились на шестые, тринадцатые, двадцатые и двадцать седьмые сутки культивирования. Для каждой временной точки использовали по 3–4 культивационных сосуда в качестве биологических повторностей. На графиках приведены средние значения и стандартное отклонение (SD), если не указано иное. Данные проверяли на нормальное распределение с помощью теста Шапиро–Вилка (в случае малого размера выборок – ростовые показатели) и теста Д'Агостино–Пирсона. Для измерения статистической значимости различий между экспериментальными вариантами использовали тест Тьюки при проведении двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Статистическая обработка, анализ данных и построение графиков проводились в программе GraphPad Prism, Dotmatics и Excel, Microsoft Corporation.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ростовые характеристики. Жизнеспособность культур проверяли до пассажа посредством окрашивания витальным красителем нейтральным красным (рис. 1). Показано, что подавляющее большинство визуализированных клеток жизнеспособно и окрашено в красный цвет, клетки имеют паренхимную форму и достаточ-

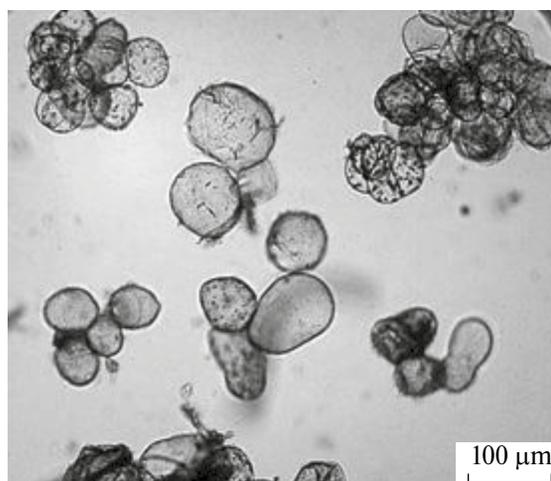


Рис. 1. Микрофотография каллусной культуры *L. angustifolia*

но крупные размеры. Ростовые характеристики культур, выращиваемых при световом (рис. 2а) и темновом (рис. 2б) режимах освещения, представленные в виде кривых роста и производных от них (индекс роста, удельная скорость роста и время удвоения) (табл. 2), позволяют отнести каллусные культуры лаванды узколистной к хорошо растущим. Индексы роста в среднем равны 4, удельная скорость роста μ находится в пределах 0.11 – 0.13 сут.⁻¹ Лучшая удельная скорость роста достигала 0.16 ± 0.01 сут.⁻¹ (индекс роста 7.53 ± 0.59) и была показана для культуры, выращиваемой на среде 2Н.

Фитохимический анализ. По результатам предварительного фитохимического анализа во всех образцах были обнаружены кумарины, дубильные вещества и флавоноиды. Методом ТСХ в системе *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 2) в УФ- и видимом свете были предварительно идентифицированы кверцетин, лютеолин, апигенин, рутин, розмариновая, хлорогеновая и кофейная кислоты [21].

Результаты количественного анализа суммы ФС по методу Фолина–Чокальтеу во всех образцах клеточных культур при световом (рис. 3а) и темновом (рис. 3б) режимах культивирования показали сходные тенденции зависимости содержания ФС от времени – максимальное содержание достигалось к 13 дню культивирования, а затем наблюдалось снижение. По результатам ANOVA и теста Тьюки для множественных сравнений статистически значимый ($P < 0.0001$) вклад в различия между отдельными опытами дают время (12.13%), тип среды (30.65%) и их сочетание (15.57%) (табл. 3). Световой режим не влияет на накопление ФС со статистической значимостью. По результатам множественных сравнений можно заключить, что культура, выращенная на среде 2Н,

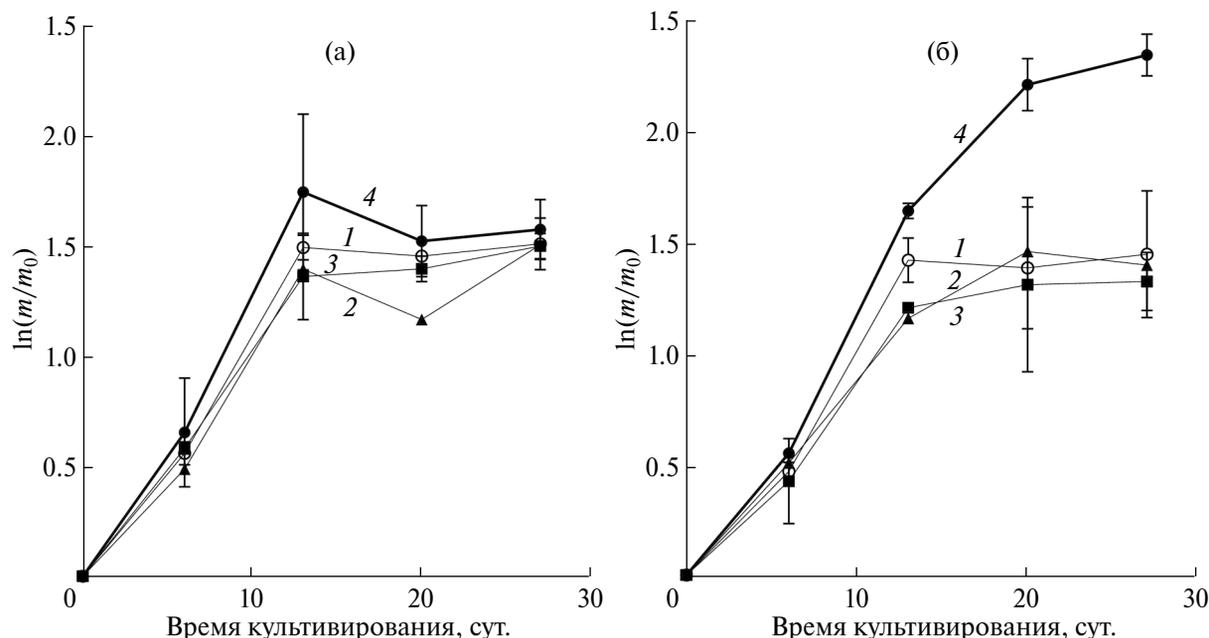


Рис. 2. Кривые роста клеток каллусной культуры *L. angustifolia* в полулогарифмической системе координат при световом (а) и темновом (б) режимах освещения на питательных средах, содержащих: 1 – α -НУК (2.0 мг/л) + кинетин (0.001 мг/л); 2 – 2,4-Д (2.0 мг/л) + БАП (2.0 мг/л); 3 – α -НУК (1.0 мг/л) + БАП (0.5 мг/л); 4 – α -НУК (2.0 мг/л) + БАП (0.1 мг/л).

Таблица 2. Ростые характеристики каллусных культур *L. angustifolia*

Условия культивирования		Индекс роста, I	Удельная скорость роста, μ , сут. ⁻¹	Время удвоения, τ , сут.
Контроль	Темновой режим	3.7 ± 0.2	0.13 ± 0.01	5.36 ± 0.16
	Световой режим	4.2 ± 0.5	0.13 ± 0.01	5.53 ± 0.24
2Д	Темновой режим	3.5 ± 0.2	0.12 ± 0.02	5.86 ± 0.09
	Световой режим	3.3 ± 0.6	0.12 ± 0.02	5.96 ± 0.13
1Н	Темновой режим	3.5 ± 0.3	0.12 ± 0.04	5.90 ± 0.20
	Световой режим	3.8 ± 1.4	0.12 ± 0.01	6.05 ± 0.14
2Н	Темновой режим	5.6 ± 1.3	0.14 ± 0.01	5.02 ± 0.23
	Световой режим	7.5 ± 0.6	0.16 ± 0.01	4.29 ± 0.08

содержащей 2.0 мг/л α -НУК и 0.1 мг/л БАП, дает больший выход фенольных соединений в сравнении с остальными. Таким образом, данный состав продемонстрировал наиболее высокие значения ростовых параметров и содержания фенольных соединений.

На следующем этапе работы химический состав каллусных культур в сравнении с ЛРС лаванды узколистной был проанализирован методом ВЭЖХ-УФ при длине волны 254 нм. В отличие от хроматограммы ЛРС, на которой наблюдается не менее 30 пиков, компонентный состав каллусных культур является менее

разнообразным – хроматограммы содержат от 3 до 6 основных пиков. На рис. 4 представлены ВЭЖХ хроматограммы 96% этанольного экстракта цветков *L. angustifolia* (рис. 4а) и каллусной культуры 2Н (рис. 4б). Особый интерес представляет пик со временем удерживания ~21 мин, обнаруженный на всех хроматограммах и количественно превосходящий все прочие. На основании справочных данных и сравнения времени удерживания/УФ-спектра со стандартным образцом розмариновой кислоты, данное вещество было идентифицировано как розмариновая кислота. Для сравнения содержа-

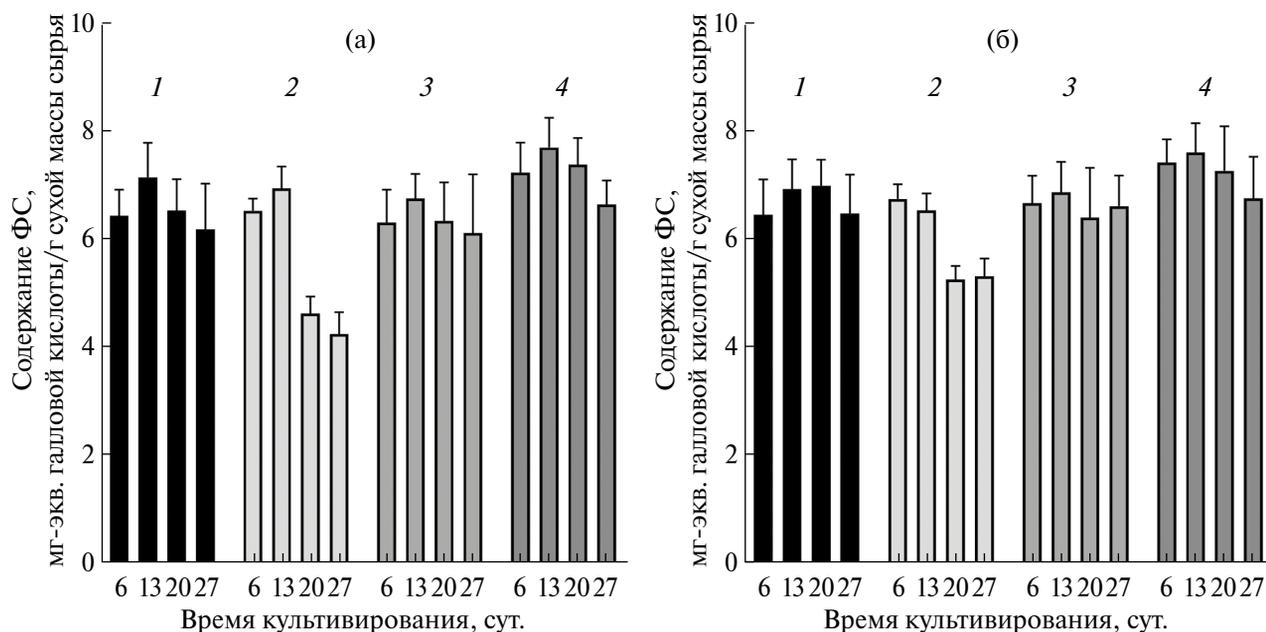


Рис. 3. Динамика содержания фенольных соединений в каллусной культуре клеток *L. angustifolia* при световом (а) и темновом (б) режимах культивирования на средах, содержащих: 1 – α -НУК (2.0 мг/л) + кинетин (0.001 мг/л); 2 – 2,4-Д (2.0 мг/л) + БАП (2.0 мг/л); 3 – α -НУК (1.0 мг/л) + БАП (0.5 мг/л); 4 – α -НУК (2.0 мг/л) + БАП (0.1 мг/л).

Таблица 3. Статистическая значимость различий в содержании ФС в культурах на разных средах при различной длительности культивирования

К	13 день								
	20 день	ns							
2Д	13 день	ns	ns						
	20 день	****	****	****					
1Н	13 день	ns	ns	ns	****				
	20 день	***	ns	ns	****	ns			
2Н	13 день	**	****	****	****	****	****		
	20 день	ns	*	*	****	*	****	ns	
		13 день	20 день						
		К		2Д		1Н		2Н	

Примечание: ns – различия статистически не достоверны, * – P от 0.01 до 0.05, ** – P от 0.001 до 0.01, *** – P от 0.0001 до 0.001, **** – $P < 0.0001$.

ния розмариновой кислоты в сырье интактного растения лаванды и каллусных культур проводили ВЭЖХ-анализ их экстрактов. В качестве объектов исследования использовали высушенные цветки *L. angustifolia* и каллусную культуру, выращенную на среде 2Н. Все эксперименты проводились в трех повторностях, данные представлены в виде среднего значения трех измерений со стандартной ошибкой ($P < 0.05$).

Содержание розмариновой кислоты в каллусе *L. angustifolia* на среде 2Н достигло $1.26 \pm 0.13\%$, тогда как в цветках интактного растения оно составило всего $0.33 \pm 0.009\%$. Причем следует отметить, что на ВЭЖХ-хроматограмме каллусной культуры (рис. 4б) относительная площадь пика розмариновой кислоты составила примерно 50.0% в сравнении с 11.5% на хроматограмме цветков (рис. 4а).

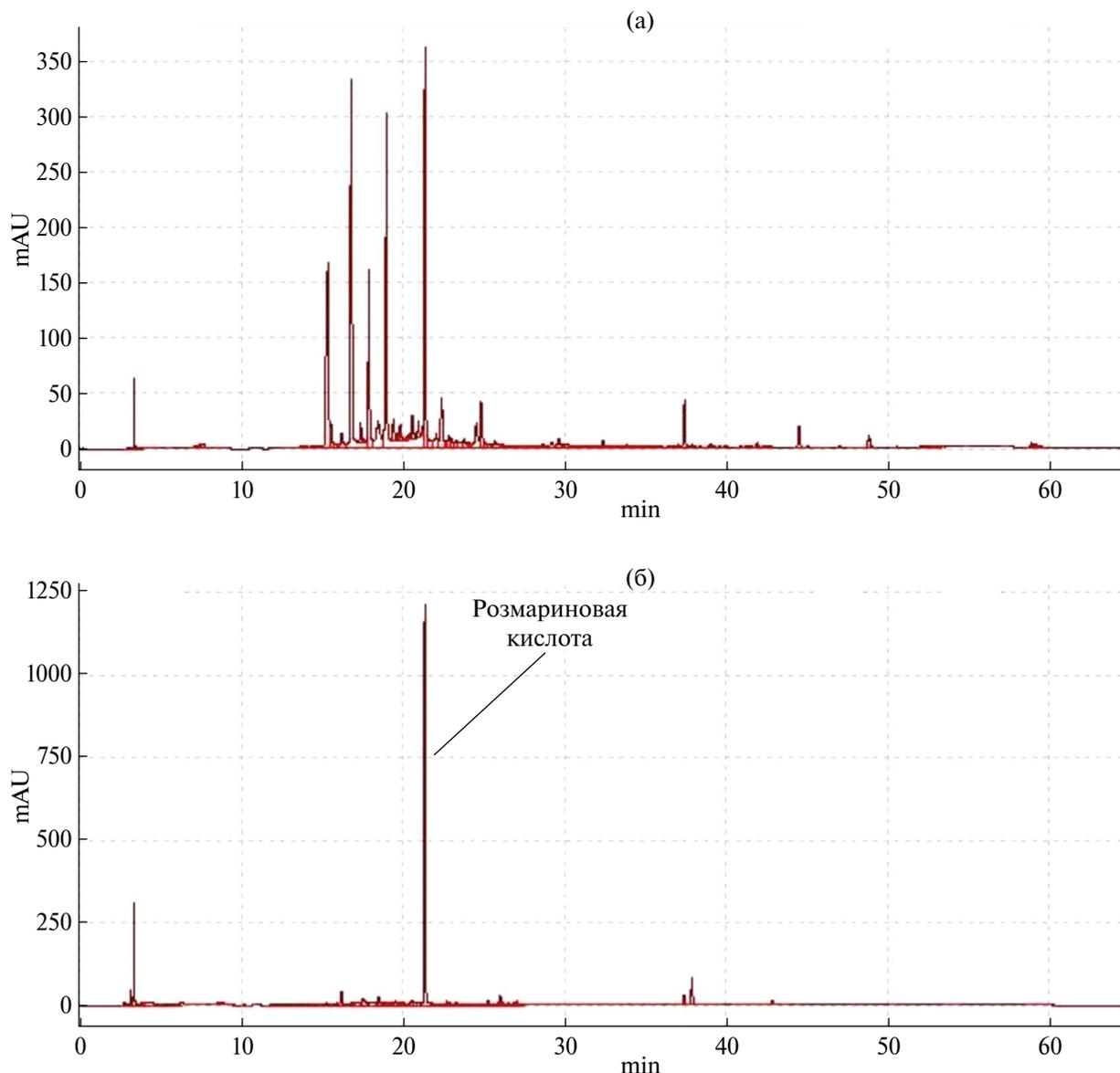


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограммы 96% этанольного экстракта цветков *L. angustifolia* (а) и каллусной культуры 2Н (б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали перспективность *in vitro* культур лаванды узколистной в качестве потенциального источника розмариновой кислоты. Розмариновая кислота — эфир кофейной кислоты и 3,4-дигидроксифенил молочной кислоты — достаточно часто встречается в растениях семейства *Lamiaceae*. Данное соединение имеет широкий спектр применения в качестве консерванта и антиоксиданта в пищевой промышленности а также противовоспалительного и антиоксидантного компонента в косметических средствах. В фармацевтической промышленности розмариновая кислота используется благодаря антиоксидантным, гепатопротекторным, нефропротекторным, противовоспалительным и противоаллергическим свойствам [22–26]. В настоящее время одними

из наиболее используемых источников для выделения розмариновой кислоты являются *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia miltiorrhiza* Bunge и *Mentha spiciata* L. [22]. Ряд исследований посвящен разработке методов получения розмариновой кислоты из растительного сырья, включая подходы биотехнологии и метаболической инженерии [27–29].

Первое биотехнологическое производство розмариновой кислоты было осуществлено с использованием суспензионной культуры *Coleus blumei* (*Lamiaceae*). Было достигнуто содержание розмариновой кислоты 13–15% от сухого веса [30]. Несмотря на весьма существенный выход, был проведен ряд опытов по его увеличению — эффективность продемонстрирована заменой глюкозы на сахарозу: 4% содер-

жание сахарозы в среде привело к увеличению выхода до 19%, а 5% – к рекордным 36% [31, 32]. Также существенный результат показывает добавление элиситоров, сверхэкспрессия различных ферментов, непрерывное культивирование в биореакторе (нежели периодическое или в шейкере-инкубаторе) [28].

Увеличение содержания целевого компонента (в данном случае розмариновой кислоты) относительно суммарного содержания БАВ в культуре *in vitro* даже при снижении его абсолютных значений, а также общее обеднение компонентного состава каллусов в сравнении с растительным сырьем позволяет предположить удешевление его выделения и очистки в промышленных масштабах. Значительной проблемой экстрагирования БАВ из интактных растений является невозможность получения индивидуального соединения с высоким выходом без дорогостоящих, высокотехнологичных либо достаточно длительных этапов тонкой очистки. В случае культур растительных клеток посредством подбора условий, питательных сред и стрессовых факторов (upstream-процессы), существует возможность многократно удешевить стадии downstream, чем решить одну из основных проблем промышленной переработки растительного сырья.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам проведенных исследований был предложен состав питательной среды, обладающей наилучшими характеристиками для культивирования каллусной культуры лаванды узколистной как в лабораторной практике, с учетом выдающейся скорости роста культуры, так, в перспективе, и в промышленности. Из четырех исследованных сред наиболее высокие значения ростовых параметров и содержания розмариновой кислоты были получены на среде, содержащей 2.0 мг/л α -НУК и 0.1 мг/л БАП. Установлено, что световой режим не оказывает статистически значимого влияния на скорость роста и накопление фенольных соединений. Показана перспективность применения полученного штамма культуры лаванды узколистной для производства розмариновой кислоты. Масштабирование технологии требует дополнительных исследований, связанных с адаптацией штамма к суспензионному культивированию.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Popova E.V., Nosov A.V., Titova M.V., Kochkin D.V., Fomenkov A.A., Kulichenko I.E., Nosov A.M. Advanced biotechnologies: Collections of plant cell cultures as a basis for development and production of medicinal preparations // Russ. J. Plant. Physiol. 2021. V. 68. P. 385. <https://doi.org/10.1134/S102144372103016X>
2. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures // J. Med. Plants. Res. 2009. V. 3. P. 1222.
3. Kirimer N., Mokhtarzadeh S., Demirci B., Goger F., Khawar K.M., Demirci F. Phytochemical profiling of volatile components of *Lavandula angustifolia* Miller propagated under *in vitro* conditions // Ind. Crops Prod. 2017. V. 96. P. 120. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.061>
4. Woronuk G., Demissie Z., Rheault M., Mahmoud S. Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents // Planta Med. 2011. V. 77. P. 7. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250136>
5. Stanciu G.A., Aonofriesei F., Lupsor S.I., Popescu A.N., Sirbu R.O. Study of phenolic compounds and antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* flowers macerates // Rev. de Chim. 2019. V. 70. P. 1800.
6. Adaszyńska-Skwirzyńska M., Dzieciół M. Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (*Lavandula angustifolia*) derived from Poland // Nat. Prod. Res. 2017. V. 31. P. 2575. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1320792>
7. Batiha G.E., Teibo J.O., Wasef L.G., Shaheen H.M., Akomolafe A.P., Teibo T.K., Al-kuraishy H.M., Al-Garbeeb A.I., Alexiou A., Papadakis M. A review of the bioactive components and pharmacological properties of *Lavandula* species // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2023. V. 396. P. 877. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02392-x>
8. Bouyahya A., Chamkhi I., El Menyiy N., El Mouden H., Harhar H., El Idrissi Z.L., Khouchlaa A., Jouadi I., El Baaboua A., Taha D., Balahbib A., Khalid A., Abdalla A.N., Zengin G., Simal-Gandara J., El Omari N. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacological properties of *Lavandula dentata* L.: a comprehensive review // S. Afr. J. Bot. 2023. V. 154. P. 67. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.01.023>
9. Saeed F., Afzaal M., Raza M.A., Rasheed A., Husain M., Nayik G.A., Ansari M.J., 2023. Lavender essential oil: Nutritional, compositional, and therapeutic insights // Essential Oils / Eds. G.A. Nayik, M.J. Ansari. Cambridge: Academic Press, 2023. P. 85.
10. Yadikar N., Bobakulov K., Li G. Aisa H.A. Seven new phenolic compounds from *Lavandula angustifolia* // Phytochem. Lett. V. 23. P. 149. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.12.005>
11. Al-Bakhit A.A., Sawwan J.S. and Al-Mahmoud M.S. *In vitro* propagation of two *Lavandula* species: *Lavan-*

- dula angustifolia* and *Lavandula latifolia* L. *Medica* // Jordan J. *Agricult. Sci.* 2007. V. 3. P. 16.
12. Gonçalves S., Romano A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula spp.*) and the production of secondary metabolites // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 166. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.006>
 13. Пивоварова Н.С., Шебитченко Т.С., Некрасова Д.А., Данилова А.А., Бугаев А.С., Бронских Е.Д., Пovyдыш М.Н. Новые объекты в коллекции культур клеток высших растений Санкт-Петербургского Химико-Фармацевтического Университета // Сандеровские чтения. Сборник материалов конференции, посвященной памяти выдающегося отечественного ученого в области технологии лекарств Ю.К. Сандера / Под ред. Маймистова Д.Н. и др. Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. С. 198.
 14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473.
 15. Егорова Н.А. Изменчивость каллусных культур лаванды при длительном пассировании *in vitro* // Таврич. вестн. аграр. науки. 2017. Т. 1. С. 15.
 16. Якимова О.В. Морфогенез *in vitro* и клональное микроразмножение перспективных эфиромасличных растений семейства *Lamiaceae* – *Melissa officinalis* L. и *Origanum vulgare* L. Дисс. ... канд. биол. наук. Симферополь: ФГБУН “НИИСХ Крыма”, 2019. 192 с.
 17. Nishikawa K., Shimomura K., Kayano T., Yoshihira K., Ishimaru K., Flavonoids in Callus Cultures of *Scutellaria baicalensis* // *Japanese J. Food Chem. Saf.* 1996. V. 3. P. 35.
 18. Юрин В.М., Дитченко Т.И., Молчан О.В., Шанчиц М.П., Ромашко С.Н., Булатова А.А., Логвина А.О. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза // Труды Белорус. гос. ун-та. 2009. Т. 4. С. 168.
 19. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1, М.: Мин-во здравоохранения, 2018. 1814 с.
 20. Lamuela-Raventós R.M. Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity: recent trends and applications // *Measurement of antioxidant activity & capacity* / Eds. R. Aрак, E. Capanoglu, F. Shahidi, Hoboken. John Wiley & Sons Ltd., 2018. P. 107. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>
 21. Иванов П.А., Хабаров В.А. Изучение полифенольного комплекса культуры клеток лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* L.) // Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XII всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием / Под ред. Д.Н. Маймистова. Санкт-Петербург: ФГБОУ ВО СПХФУ, 2022. С. 172.
 22. Marchev A.S., Vasileva L.V., Amirova K.M., Savova M.S., Koycheva I.K., Balcheva-Sivenova Z.P., Vasileva S.M., Georgiev M.I. Rosmarinic acid—from bench to valuable applications in food industry // *Trends Food Sci. Technol.* 2021. V. 117. P. 182. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.015>
 23. Stansbury J. Rosmarinic acid as a novel agent in the treatment of allergies and asthma // *J. Restor. Med.* 2014. V. 3. P. 121. <http://dx.doi.org/10.14200/jrm.2014.3.0109>
 24. Noor S., Mohammad T., Rub M. A., Raza A., Azum N., Yadav D.K., Hassan M.I., Asiri A.M. Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid // *Arch. Pharm. Res.* 2022. V. 45. P. 205. <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01378-2>
 25. Ngo Y.L., Lau C.H., Chua L.S. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential // *Food Chem. Toxicol.* 2018. V. 121. P. 687. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.064>
 26. Alagawany M., Abd El-Hack M.E., Farag M.R., Gopi M., Karthik K., Malik Y.S., Dhama K. Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits // *Anim. Health Res. Rev.* 2017. V. 18. P.167. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000081>
 27. Khojasteh A., Mirjalili M.H., Hidalgo D., Corchete P., Palazon J. New trends in biotechnological production of rosmarinic acid // *Biotechnol. Lett.* 2014. V. 36. P. 2393. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1640-0>
 28. Kim G.D., Park Y.S., Jin Y.H., Park C.S. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 2083. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6395-6>
 29. Khojasteh A., Mirjalili M.H., Alcalde M.A., Cusido R.M., Eibl R., Palazon J. Powerful plant antioxidants: A new biosustainable approach to the production of rosmarinic acid // *Antioxidants.* 2020. V. 9. P. 1273. <https://doi.org/10.3390/antiox9121273>
 30. Xu H., Kim Y.K., Jin X., Lee S.Y., Park S.U. Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze // *J. Med. Plants Res.* 2008. V. 2. P. 237. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9001095>
 31. Petersen M., Szabo E., Meinhard J., Karwatzki B., Gertlowski C., Kempin B., Fuß E. Biosynthesis and accumulation of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei* // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 1995. V. 43. P. 89. <https://doi.org/10.1007/BF00052161>
 32. Hippolyte I., Marin B., Baccou J.C., Jonard R. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. // *Plant Cell Rep.* 1992. V. 11 P. 109. <https://doi.org/10.1007/BF00232160>

УДК 581.1

СПЕЦИФИКА РОСТА И НАКОПЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ У РАСТЕНИЙ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *Lychnis chalconica*, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ЭКСПЛАНТОВ РАЗНЫХ ОРГАНОВ

© 2024 г. И. Ф. Головацкая^а*, Ю. В. Медведева^а, М. К. Кадырбаев^а, Е. В. Бойко^а^аФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Национальный исследовательский Томский государственный университет”, Томск, Россия*e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Поступила в редакцию 16.09.2023 г.

После доработки 17.11.2023 г.

Принята к публикации 09.12.2023 г.

Флавоноиды имеют многочисленные функции в растении, одной из которых является регуляция роста. В ходе исследования получены каллусные культуры от разных структурных элементов – корня, гипокотыля, основания побега и семядоли 5- и 14-дневных растений лихниса хальцедонского (*Lychnis chalconica* L.), изучены темпы роста соответствующих каллусных тканей и накопление ими флавоноидов (Фл). Спектрофотометрически определено суммарное содержание Фл в листьях разных ярусов вегетирующих растений. Методом ВЭЖХ проанализировано содержание трех Фл: рутин (Р), кверцетин (КВ) и дигидрокверцетин (ДГКВ) в корнях, листьях и соцветиях цветущих растений, культивируемых на дерново-подзолистой почве Томской области (Россия). Изучены рост и суммарное содержание фенольных соединений и трех Фл у каллусной и суспензионной культур, полученных от эксплантов корня молодых растений лихниса. Установлены особенности роста и органоспецифичность в накоплении индивидуальных Фл. Показана зависимость физиологического состояния листьев и клеточных культур от содержания Фл. Суспензионная культура (10 пассаж), полученная из каллуса корня (92 пассаж), на 14 сутки имела близкое содержание Р и ДГКВ с исходной линией каллусной культуры и более низкий уровень КВ. В корнях цветущих растений присутствовал преимущественно ДГКВ, тогда как в соцветиях и верхних листьях – Р. Установлена тенденция уменьшения Р в ряду органов: соцветие \geq листья $>$ корень. В распределении КВ показана обратная Р зависимость. Содержание ДГКВ в листьях было в 1.9 раза меньше ($P < 0.05$), чем в соцветии. Уровень этого Фл в корнях был многократно выше ($P < 0.05$), чем в надземных органах. Вслед за увеличением окислительного статуса зрелого листа вегетирующих растений лихниса относительно молодого листа активировались осмотическая и антиоксидантная системы, включающие пролин и суммарный уровень Фл. В тоже время каллус (6 пассаж), полученный на основе более молодых тканей гипокотыля 5-дневных проростков, имел следовые количества изученных Фл, тогда как каллус, сформированный из более зрелых тканей основания побега 14-дневных проростков, характеризовался более высоким уровнем разных Фл. На основе полученных данных можно предположить участие Фл в регуляции роста листьев и клеточных культур за счет их антиоксидантных или регуляторных свойств.

Ключевые слова: *Lychnis chalconica*, каллусная культура, метод ВЭЖХ, почвенная культура, суспензионная культура клеток, флавоноиды

DOI: 10.31857/S0015330324030074, EDN: NMKOEI

ВВЕДЕНИЕ

Ухудшение условий существования растений в силу изменения климата и загрязнения почвы вследствие интенсивной сельскохозяйственной, нефте- и рудодобывающей деятельности человека, усиленная эксплуатация дикорастущих и плантационных растений – традиционного

источника лекарственных средств – приводят к растущему дефициту сырья. Использование культур клеток и тканей растений в качестве источника биологически активных веществ (БАВ) помогает спасти от уничтожения редкие дикорастущие растения, синтезирующие необходимые для жизнедеятельности человека вещества. Кроме того, этот биотехнологический метод позволяет решить проблему круглогодичного получения БАВ в отсутствие загрязнения патогенами и их продуктами жизнедеятельности

Сокращения: ВМ – вторичные метаболиты; ДГКВ – дигидрокверцетин; КВ – кверцетин; Про – пролин; Р – рутин; Фл – флавоноиды; ФС – фенольные соединения; ЦК – цитокинины.

и др. [1]. В случае, если условия культивирования установлены и стандартизированы, то производство желаемых БАВ постоянно, в то время как в интактных растениях их концентрация зависит от многих факторов.

Растения характеризуются способностью синтезировать вторичные метаболиты (ВМ), среди которых выделяют многочисленную группу флавоноидов (Фл). Фл представляют собой класс гидроксированных фенольных соединений (ФС), имеющий сложную гетероциклическую структуру. Фл построены на основе структуры С₆ (кольцо А)-С₃ (кольцо С)-С₆ (кольцо В). В зависимости от степени окисления трехуглеродного участка, Фл разделяют на антоцианы (дигидрофлавонолы), флавононы, флавоны, флавонолы и изофлавонолы [2–4].

Биогенетическим предшественником Фл служит фенилаланин, который образуется в шикиматном пути в хлоропластах и из которого в цитозоле синтезируются Фл. Комплекс Фл с глутатионом транспортируется АВС-переносчиком в вакуоли клетки, где происходит их накопление и хранение [1, 5, 6]. Фл могут накапливаться в свободном пространстве и хлоропластах [1].

На накопление БАВ в растениях влияют их стадии развития и возраст [7]. Многие лекарственные растения накапливают большое количество ВМ в основном в период репродуктивного роста. На стадии плодоношения корень и корневище 2-летней *Echinacea purpurea* (L.) Moench имеют более высокий уровень цикориевой кислоты, а *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae) – фенолов, тогда как олеаноловая кислота и экидистерон в корне *Achyranthes bidentata* выше в период вегетативного роста. Содержание общих Фл в корне *Scutellaria baicalensis* Georgi стабильно на протяжении всей стадии роста, но содержание байкалина увеличивается, а затем постепенно снижается. Содержание сапонинов в *Panax ginseng* С.А. Меу. увеличивается с возрастом растения. В процессе жизнедеятельности растений меняется состав ВМ. Например, содержание рутина (Р) и кверцетина (КВ) максимально у 7-летних растений, магнолола – у 10-летних растений, тогда как хлорогеновой кислоты, гиперина и КВ – в коре 13-летних растений *Magnolia officinalis* Rehder & E.H. Wilson.

Фл выполняют защитную функцию от патогенов, УФ-излучения и света высокой интенсивности, осуществляют биологическую коммуникацию в ризосфере, регуляцию транспорта ИУК и его метаболизма, повышают эффективность извлечения питательных веществ во время старения растения, реализуют антиоксидантную функцию [8]. Обобщая сведения для интактного растения, профессор А.М. Носов [9] среди основных функций вторичных метаболитов называет экологическую функцию. В то же вре-

мя, опираясь на принцип мультифункциональности вторичного метаболизма, он считает, что второстепенные функции метаболитов в случае культивирования клеток *in vitro* могут быть полезными для интенсивной или устойчивой пролиферации клеток.

Известно, что лихнис хальцедонский характеризуется присутствием фитостероидов, содержание которых зависит от органа, стадии развития и условий существования. В то же время представляет интерес присутствие других ВМ, которые позволяют повысить значимость вида для фармакологии. В растениях лихниса обнаружены следующие Фл: виценин, витексин и неовитексин [10]. В совокупности комплекс Фл оказывает противовоспалительную и анальгетическую активность [11].

Для оценки важности отдельных лекарственных растений для фармакологии необходимо изучить органно-тканевую специфичность тех или иных лекарственных компонентов, а также взаимосвязь между морфогенезом, синтезом и накоплением этих компонентов в лекарственных растениях. Выявление закономерностей накопления Фл необходимо и для решения проблемы расширения разнообразия продукции растениеводства.

В связи с этим целью исследования явилось изучение роста и содержания индивидуальных веществ флавоноидной природы в каллусных и суспензионных культурах, полученных на основе эксплантов разных органов молодых растений *Lychnis chalconica* L. Кроме того, нами изучено суммарное содержание ФС и их отдельных представителей в интактных растениях на вегетативной и репродуктивной стадиях онтогенеза. Выполнено сравнительное исследование суммарного накопления Фл и близких по структуре Фл: Р, КВ и дигидрокверцетина (ДГКВ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Работу выполняли на растениях лихниса хальцедонского (*Lychnis chalconica* L.) и его каллусных и суспензионной культурах. Одна группа растений лихниса выращена в природных условиях на дерново-подзолистой почве Томской области и получены семена. Другая группа растений выращена в условиях лаборатории в осветительной установке при плотности потока фотонов 130–170 мкмоль/(м² с), при 16-часовом фотопериоде и температуре воздуха 20–22°C на почвогрунте “Гарант” Универсал цветочный (ПК “Темп-2”, Кисловка, Томская область). Грунт содержал (мг/кг): N – 40, P₂O₅ – 70, K₂O – 150 и микроэлементы (Mg, Fe, Cu, Mo, B, Mn). Состав почвогрунта: 25% – биогумус, 35% – торфоперегной, 35% – торфонизинный, переходный, 5% – песок речной, рН 6.5–7.0.

У вегетирующих 1,5-месячных растений, выросших на почвогрунте, анализировали биохимические параметры листьев разных ярусов, при этом ввели понятия: молодые, зрелые и стареющие листья. В качестве параметров для выделения групп листьев использовали площадь пластинки и интенсивность ее окраски. Молодыми листьями считали активно растущие листья, зрелыми – завершившие растяжение листовой пластинки, стареющими – теряющие интенсивность зеленой окраски (данные не приведены). Для характеристики физиологического состояния листьев дополнительно анализировали интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень свободного пролина (Про). Для анализа листья брали в утренние часы (через 2 ч после начала освещения).

У цветущих 3-месячных растений природной популяции оценивали уровень Фл в различных органах (корень, листья цветочного побега, соцветия).

У каллусных (6 и 92 пассаж) и суспензионных (10 пассаж) культур определяли ростовые показатели и содержание индивидуальных Фл и суммы ФС.

Получение стерильных проростков. Сухие семена лихниса стерилизовали раствором, содержащим 96% $C_2H_5OH:H_2O:33\% H_2O_2$ в соотношении 13:1:1 по объему [12]. Для этого семена помещали на 15 мин в чашки Петри на стерильные бумажные фильтры, смоченные стерилизующим раствором, в ламинарном боксе БМБ-II-“Ламинар-С”-1.8 (Neoteric, Россия), затем высушивали в потоке воздуха ламинара и перед посевом обрабатывали под УФ в течение 2 мин. Семена (по 15–20 шт.) переносили

в сосуды для культивирования на 50% безгормональную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС-среда) [13], содержащую 4.5 г/л агара, 15 г/л сахарозы и 0.5 мг/л каждого витамина (тиамин, никотиновая кислота, пиридоксин), рН 5.7–5.8. Из стерильных семян в асептических условиях выращивали 5- и 14-дневные растения. У 5-дневных растений лихниса семядольные листья достигали 6–8 мм и появился первый настоящий лист (рис. 1а), тогда как у 14-дневных растений начала формироваться розетка из двух настоящих листьев размером 10–15 мм (рис. 1б), корни имели длину около 10 мм. Растения были рассечены на разные структурные элементы (корень, гипокотиль, основание побега – стебель с почками, семядоли), которые были использованы в качестве эксплантов.

Получение каллусных культур. Экспланты переносили на 50% МС-среду, содержащую гормоны НУК (2 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) и культивировали в темноте при температуре $23 \pm 1^\circ C$. Полученный от эксплантов каллус переносили вместе с эксплантом на свежую МС-среду того же состава, а при хорошем приросте каллуса его отделяли от экспланта и культивировали отдельно [1]. Для получения каллуса от эксплантов гипокотили использовали стерильные 5-дневные растения лихниса (рис. 1а). Размер гипокотили в этот период не превышал 2–3 мм, что замедляло образование каллуса, однако позднее выделение гипокотили из растений было затруднено, так как уже с 4–5 суток начинался следующий этап развития – формирование побега с узлами и настоящими листьями. Оптимальным возрастом растений для выделения эксплантов из семядольных листьев были 5 сутки. В этом возрасте

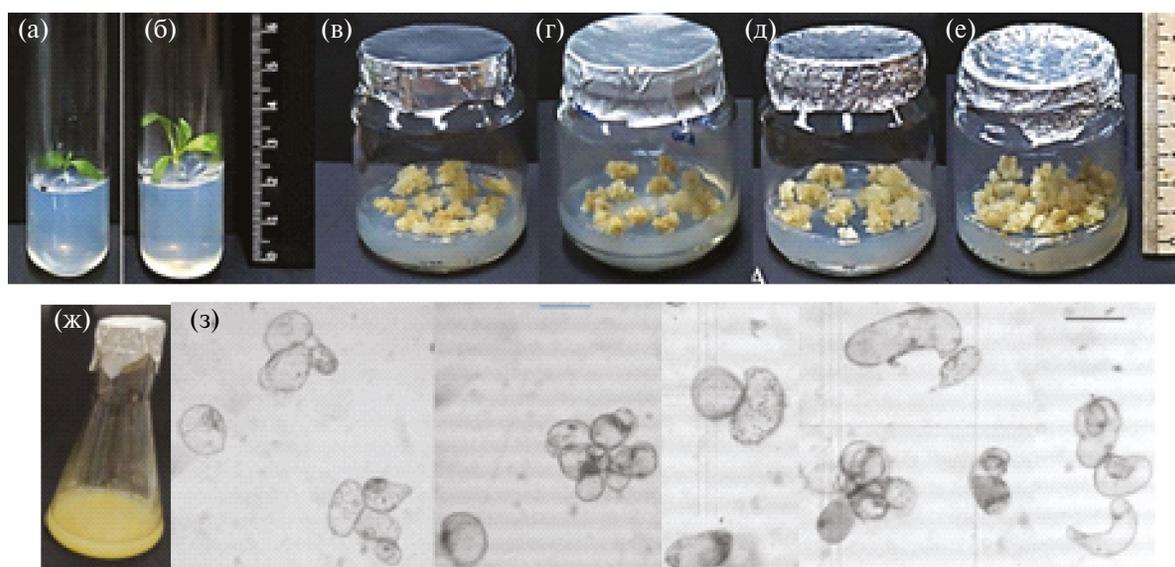


Рис. 1. Стерильные 5- (а) и 14-дневные (б) растения *Lychnis chalcedonica*; каллусная культура линий 5Г (в), 14ОП (г), 5К (д) и 14К (е) через 25 суток культивирования (6 пассаж); суспензионная культура (ж) и ее клетки (з). Экспланты: Г – гипокотиль, ОП – основание побега, К – корень. Размер бара – 100 мкм.

семядольные листья достигали длины 8–10 мм (рис. 1а). На эксплантах, взятых с 14-дневных растений, наблюдали менее интенсивное калусообразование (рис. 1б). Первичный каллус формировался плотным и имел светло-зеленую или желто-зеленую окраску.

Из полученных каллусов было отобрано несколько линий для дальнейшего культивирования: 5Г, 14СЛ, 14К, 14ОП (рис. 1в, 1г, 1д, 1е). Отбор проводили по следующим критериям: сохранение разнообразия исходных эксплантов; отсутствие посторонних морфогенных структур на первичном каллусе; стабильный рост; хорошая выживаемость, отсутствие значительных некрозов.

Получение суспензионной культуры корня. Суспензионную культуру лихниса получали из длительно культивируемой каллусной культуры корня (92 пассаж), которую помещали в плоскодонные конические колбы Эрленмейера с жидкой МС-средой. Колбы размещали на орбитальном шейкере Multi PSU-20 BIOSAN (SIA Biosan, Латвия), режим перемешивания (100–110 об/мин), температура 25–26°C. Исходная навеска каллусной культуры (4 г) была помещена в 50 мл МС-среды. Через 21 сутки было проведено первое пассирование с последующим 10–15-кратным субкультивированием через каждые 14 суток. За это время суспензионная культура перешла к экспоненциальной стадии роста и представляла собой мелкие клеточные агрегаты и отдельные клетки (рис. 1ж, 1з).

Ростовые параметры культур. Используя гравиметрический метод, определяли свежую (FW) и абсолютно сухую (DW) биомассу каллусов с помощью аналитических весов PA-114 (Ohaus, КНР). Сухую биомассу в последующем использовали для оценки содержания в ней антиоксидантов фенольной природы, в том числе Фл.

Оценку относительного прироста культуры на 28 суток производили по формуле:

$$PI_{28} = (M_{28} - M_0) / M_0, \quad (1)$$

где M_{28} – конечная сырая или сухая масса каллусов (на 28 суток субкультивирования, M_{28}), M_0 – начальная биомасса каллуса [14].

Растворимые фенольные соединения (ФС) определяли по методу Фолина-Дениса [15]. Оптическую плотность раствора измеряли при 725 нм против контроля, содержащего этанол вместо тканевого экстракта. Суммарное содержание ФС рассчитывали в пересчете на рутин и DW.

Спектрофотометрическое определение общего содержания флавоноидов. Определение суммарного содержания флавоноидов (Фл) основано на их комплексообразовании с хлоридом алюминия и последующем измерении оптической плотности

окрашенных растворов при 415 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США) [16]. Суммарное содержание Фл рассчитывали в пересчете на рутин и DW.

ВЭЖХ-анализ флавоноидов. Количественное определение Фл проводили методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity с детектором на диодной матрице DAD (Agilent Technologies Inc., США). Использовали оригинальную колонку Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 мм × 100 мм × 3.5 мкм). Обнаружение пиков проводили в диапазоне от 190 до 390 нм. Длина волны обнаружения рутина составила 254 нм, кверцетина – 290 нм, дигидрокверцетина – 360 нм. Разделение проводили с использованием смеси ацетонитрила и 0.04 М калия фосфорнокислого монозамещенного с ортофосфорной кислотой в качестве подвижной фазы (рН 2.8). Скорость потока элюента составила 0.25 см³/мин. Идентификацию индивидуальных Фл в каждом экстракте определяли путем сравнения времени удерживания и УФ-спектров образцов с данными стандартов: рутин гидрата (содержание основного вещества более 95%) (Merck, Германия), КВ (содержание основного вещества не менее 98%) (Россия), ДГКВ (содержание не менее 90%, ГОСТ 33504) (Россия) (рис. 2а, б, в).

Для количественного определения Фл в растительном сырье навеску образца для анализа (около 1 г) абсолютно сухого растительного сырья экстрагировали 70% раствором этилового спирта (10 – 20 мл, в зависимости от образца). Колбу присоединяли к рефлюкс-конденсатору и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После охлаждения фильтровали через целлюлозный фильтр [17].

Содержание Фл в растительном сырье определяли путем сравнения площади пиков, полученных при разделении индивидуальных Фл в пробе и соответствующих веществ в рабочих стандартных образцах.

Массовую концентрацию Фл рассчитывали по формуле:

$$X = (S_x \times C \times V \times 10) / (S_{\text{pco}} \times 25 \times m), \quad (2)$$

где S_x – площадь пика определяемого Фл в подготовленной пробе; S_{pco} – площадь пика рабочего стандартного раствора Фл; C – концентрация Фл в рабочих стандартных образцах, мг/см³ (0.1 мг/см³); m – навеска пробы, г; V – объем этилового спирта, добавленного для экстракции Фл, см³ [18].

Пример разделения Фл в растительном сырье приведен на рис. 3а, 3б.

Выбор данных представителей Фл был основан на их функциях в человеческом организме (для КВ – противовоспалительная, антиоксидантная, антидепрессивная, противоопухоле-

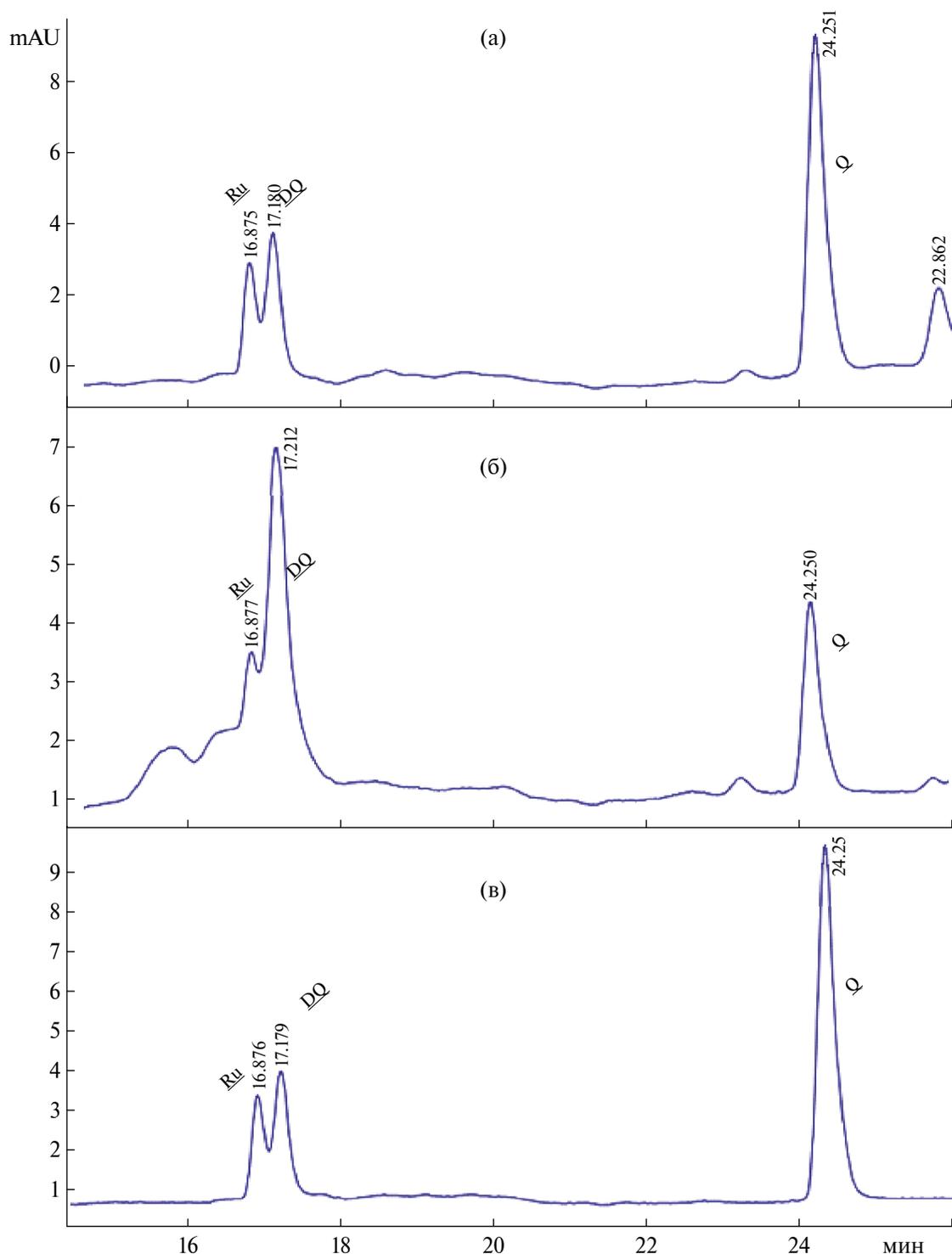


Рис. 2. Хроматографическое разделение флавоноидов стандартных растворов: а – рутин (Ru) $C = 0.1 \text{ мг/см}^3$, $\lambda = 254 \text{ нм}$ (время выхода – $16.691 \pm 0.080 \text{ мин}$); б – дигидрокверцетин (DQ) $C = 0.1 \text{ мг/см}^3$, $\lambda = 290 \text{ нм}$ (время выхода – $17.252 \pm 0.090 \text{ мин}$); в – кверцетин (Q) $C = 0.1 \text{ мг/см}^3$, $\lambda = 360 \text{ нм}$ (время выхода – $24.220 \pm 0.050 \text{ мин}$).

вая) [19] и метаболической связи [20, 21]. ДГКВ преобразуется в КВ с помощью фермента FLS (флаванолсинтазы) под контролем MYB11/12/111 (рис. 4). Гликозилирование КВ с образованием Р происходит в 2 этапа: F3GT (флавонол-3-О-глюкозилтрансфераза) превращает КВ в изокверцитрин (кверцетин-3-О-глюкозид), а затем F3G6"RhaT (флавонол-3-О-глюкозид-6"-О-рам-

нозилтрансфераза) превращает изокверцитрин в Р (кверцетин-3-О-рутинозид).

Спектрофотометрическое определение интенсивности перекисного окисления липидов. Интенсивность ПОЛ определяли по содержанию МДА, по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [22]. Для этого образец листьев измельчали в 20% растворе ТХУ. Экстракт цен-

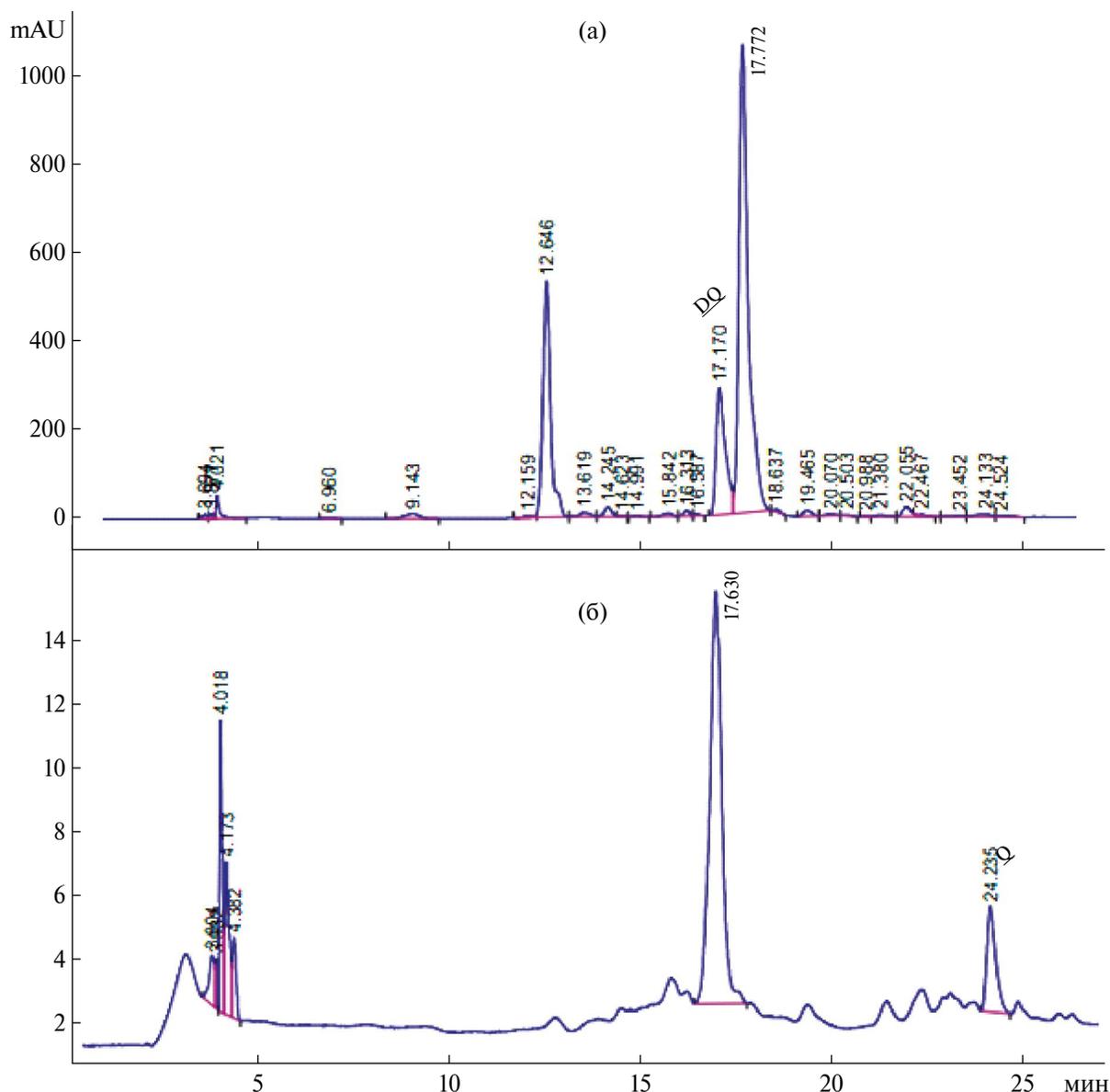


Рис. 3. Пример определения дигидрокверцетина (DQ) и кверцетина (Q) в растительном сырье: а – DQ, время выхода – 17.170 мин; б – Q, время выхода – 24.235 мин.

трифугировали на центрифуге Eppendorf 5430R (Eppendorf, Германия) в течение 15 мин при 12000 g и температуре 4°C. Цветную реакцию алиquotы супернатанта с ТБК проводили при 98°C в течение 30 мин. Оптическую плотность раствора с образовавшимся розовым хромогеном измеряли при двух длинах волн – 532 и 600 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США).

Спектрофотометрическое определение свободного пролина (Про). Уровень Про определяли по реакции с нингидрином в кислой среде [23] и измерению оптической плотности раствора при 520 нм.

Статистический анализ. Для сравнения параметров использовали параметрический t -критерий Стьюдента и непараметрический U -кри-

терий Манна-Уитни для попарного сравнения групповых параметров. На рисунках представлены средние арифметические (M) значения для роста и биохимических ($n = 5$) параметров с двухсторонними доверительными интервалами ($M \pm 1.96 \times SEM$). Различия между значениями, отмеченными разными надстрочными латинскими буквами, были статистически значимыми при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования изучены темпы роста 4-х линий 28-дневной каллусной культуры *L. chalconica*, эксплантами для которой служили гипокотили (5-дневные растения), корень, основание побега – нижняя часть стебля

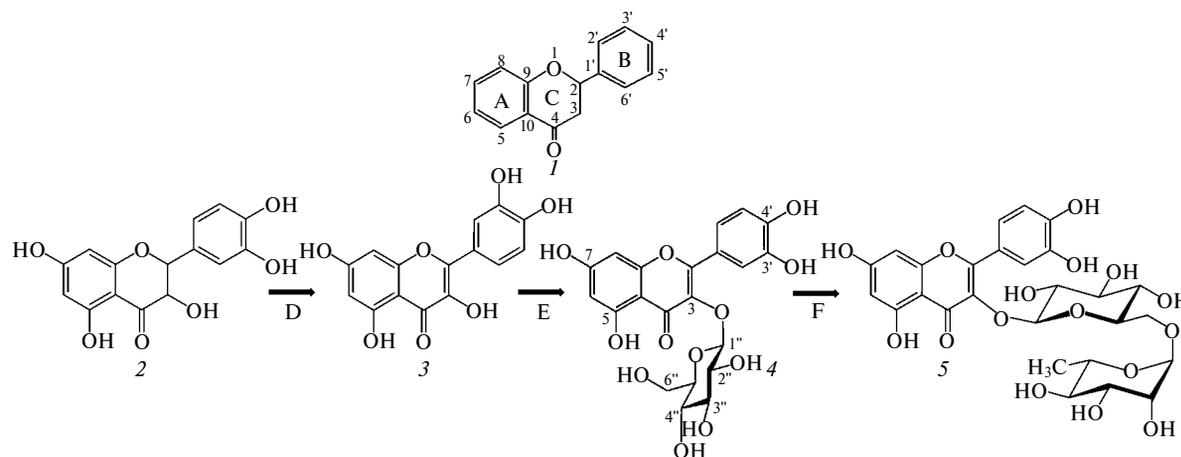


Рис. 4. Структурные формулы исследуемых флавоноидов и ферменты их биосинтеза. 1 – общая формула; 2 – ди-гидрокверцетин; 3 – кверцетин; 4 – изокверцитрин; 5 – рутин; D – FLS (флаванолсинтаза); E – F3GT (флаво-нол-3-О-глюкозилтрансфераза); F – F3G6"RhaT (флавонол-3-О-глюкозид 6"-О-рамнозилтрансфераза).

с почками и семядоли (14-дневные растения). Проведен биохимический анализ образцов растений природной популяции (у листьев разного физиологического состояния и разных органов растений) и каллусных культур на общее содержание Фл и содержание Р, КВ и ДГКВ (таксифолина). Последний представляет собой КВ, гидрированный в положениях 2 и 3 (рис. 4). Определен общий пул фенольных соединений у длительных каллусной и суспензионной культур, полученных от эксплантов корня лихниса.

Эффективность калусообразования на различных эксплантах определяли при их культивировании на МС-среде с гормонами НУК (2 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) в темноте и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Начало индукции каллуса наблюдали через 12–14 суток от начала культивирования на всех типах эксплантов. Первичный каллус лихниса имел белый, светло-желтый или светло-зеленый цвет, плотную (от эксплантов семядольных и настоящих листьев) или рыхлую, оводненную (от эксплантов гипокотилей и корней) консистенцию.

Каллусные культуры лихниса к пятому пассажу утрачивали явно выраженные внешние различия, были светло-желтого цвета, преиму-

щественно рыхлые, рассыпчатые, легко распадались на отдельные фрагменты массой 15–30 мг (рис. 1в–е). При этом линии 5К и 14К были светлее и плотнее (рис. 1д, е). В ходе субкультивирования оптимальную продолжительность пассажа для сохранения жизнеспособности культуры сокращали с 35 до 28 суток.

Спектрофотометрически и методом ВЭЖХ проанализировали суммарное содержание Фл (табл. 1) и трех индивидуальных Фл в растениях *L. chalconica* на стадии вегетации и репродукции, а также в культурах *in vitro*, полученных от эксплантов отдельных органов молодых растений (рис. 5).

Биохимический анализ растений *L. chalconica*, выросших в почвенной культуре в лабораторных условиях, показал, что содержание метаболитов, в том числе и суммарное содержание Фл, изменялось в зависимости от физиологического состояния листьев – их индивидуального возраста (разного яруса) (табл. 1).

На вегетативной стадии развития растений в почвенной культуре отмечали изменение интенсивности ПОЛ, оцениваемой по содержанию МДА, в листьях разных ярусов, а, следовательно, разного времени закладки и индивидуального возраста листа. Это, возможно, было связано с

Таблица 1. Содержание метаболитов в листьях разных ярусов растений лихниса в фазу вегетации

Ярусы	Физиологическое состояние листьев	МДА, мкмоль/г FW	Пролин, мкмоль/г FW	Флавоноиды, %
7–9	молодые	0.01 ± 0.001^c	0.709 ± 0.01^c	0.186 ± 0.01^b
4–6	зрелые	0.02 ± 0.002^b	0.827 ± 0.02^b	0.234 ± 0.02^a
1–3	стареющие	0.04 ± 0.002^a	1.582 ± 0.03^a	0.094 ± 0.01^c

Примечание. Одинаковыми надстрочными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

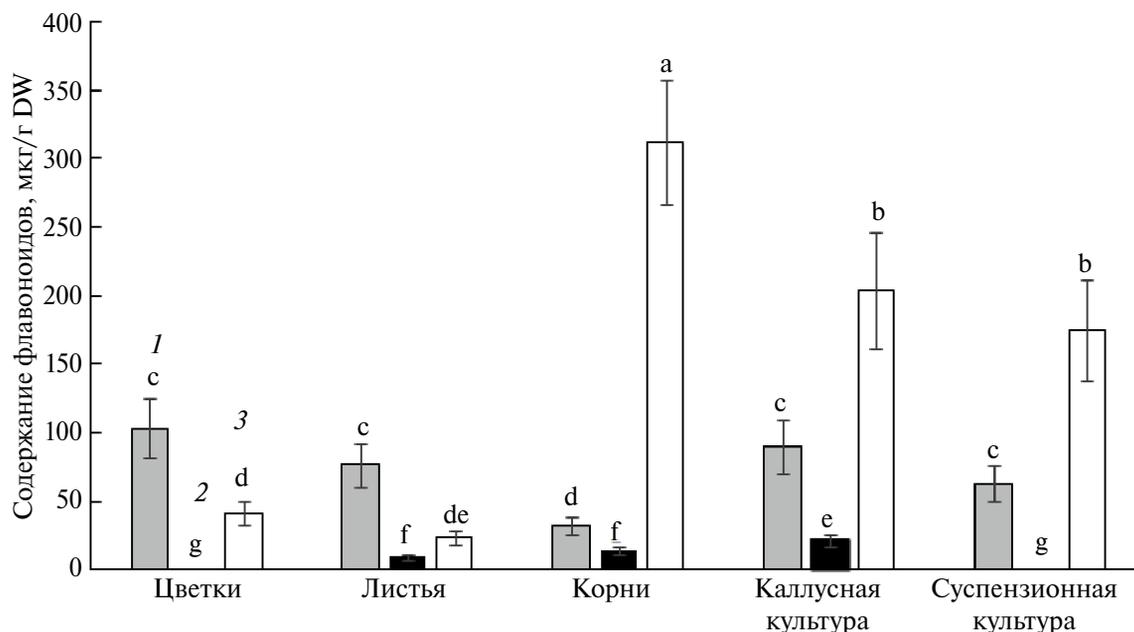


Рис. 5. Содержание индивидуальных флавоноидов в органах цветущих растений *Lychnis chalconica*, культивируемых в природной популяции, и в длительной каллусной и суспензионной культурах корней. 1 – рутин; 2 – кверцетин; 3 – дигидрокверцетин. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

физиологическим состоянием листьев в процессе их формирования. По данным анализа интенсивность ПОЛ повышалась от листьев верхних ярусов (7–9, молодые) к листьям нижних ярусов (1–3, стареющие), т.е. молодые активно растущие листья имели меньшую интенсивность ПОЛ. Вслед за увеличением окислительного статуса листа активировались антиоксидантные системы клеток листа, включающие увеличение уровня Про и суммарного уровня Фл (табл. 1). Однако при формировании систем защиты отмечено взаимовлияние их представителей: двукратное увеличение Про в стареющих листьях приводило к аналогичному снижению суммарного содержания Фл.

При исследовании цветущих растений природной популяции обнаружили органоспецифичность в накоплении индивидуальных Фл (рис. 5). В корнях присутствовал преимущественно ДГКВ, тогда как в соцветиях и верхних листьях – Р. Анализ индивидуальных Фл показал тенденцию уменьшения Р в ряду органов: соцветие \geq листья $>$ корень. В распределении КВ показана обратная Р зависимость корень \geq листья $>$ соцветие, однако с существенно меньшим абсолютным уровнем этого Фл. Содержание ДГКВ в листьях было в 1.9 раза меньше ($P < 0.05$), чем в соцветии. В то же время уровень этого Фл в корнях был многократно выше ($P < 0.05$), чем в надземных органах.

Длительно культивируемая каллусная культура (92 пассаж), полученная от эксплантов корня, аккумулировала к 30 суткам в 2.7 и 1.5 раза

больше Р и КВ соответственно и на 35% меньше ДГКВ, чем корень растений природной популяции (рис. 3). В то же время полученная из каллуса суспензия (10 пассаж) на 14 сутки имела близкое содержание Р и ДГКВ с исходной линией каллусной культуры. При этом, однако, существенно снижался уровень КВ.

Многократно больший уровень ДГКВ ($P < 0.05$) в каллусной культуре, полученной от эксплантов корня растений лихниса, согласуется с его высоким уровнем в корне интактного цветущего растения. Однако специфика существования клеток в составе каллусной ткани определяла особенности метаболизма Фл. Каллусная культура корня в сравнении с интактным органом 2.7-кратно увеличивала содержание Р и 1.5-кратно – КВ ($P < 0.05$). У активно растущей суспензионной культуры на стационарной фазе к 14 суткам снижалось содержание Р и КВ ($P < 0.05$) относительно исходной каллусной культуры. На основе полученных данных можно предположить возможное участие Фл в регуляции роста культуры за счет их антиоксидантных или регуляторных свойств.

Установив схожие уровни ДГКВ корня интродуцированных растений и длительной культуры корня *in vitro*, мы повторно получили каллусные культуры от разных эксплантов (корень, гипокотиль, основание побега, семядоля) 5- и 14-дневных растений, выросших в пробирках (рис. 1а, 1б).

Наибольший относительный прирост сырой массы на 28 сутки и обводненность клеток

отмечены у гипокотильной линии, полученной от эксплантов 5-дневных растений (табл. 2). В то время как каллусные культуры, полученные от эксплантов более взрослых растений (14-дневных) имели меньший прирост сырой массы и обводненность, но большую сухую массу.

Биохимический анализ индивидуальных Фл показал, что каллус, полученный на основе более молодых тканей гипокотыля 5-дневных проростков, имел следовые количества изученных Фл (табл. 3). В то время как более зрелые ткани основания побега (нижняя часть стебля с почками) 14-дневных проростков формировали каллус с более высокими уровнями разных представителей Фл.

Отмечена специфика в накоплении индивидуальных Фл у разных линий каллусной культуры лихниса (табл. 3). В побеговой и корневой линиях культуры шестого пассажа содержалось одинаковое количество Р, тогда как в семядольной линии его количество было в 2 раза меньше. Корневая линия содержала КВ, уровень которого был в 1.5 раза меньше по сравнению с уровнем Р. В других культурах обнаружены только следовые количества КВ. Содержание ДГКВ в побеговом каллусе было в 13 раз больше такового в семядольной линии и в 4 раза больше, чем Р в анализируемой линии. Наибольший прирост сырой массы и обводненность клеток отмечены у гипокотильной линии, имеющей следовые ко-

личества изученных Фл. Тогда как наибольший прирост сухой массы семядольной культуры происходил на фоне меньшего содержания изученных групп Фл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали зависимость содержания ФС и Фл от физиологического состояния (возраста) листьев вегетирующих растений *L. chalconica* (табл. 1), что согласуется с ранее полученными нами данными для листьев разных ярусов *Lactuca sativa* [24]. Во взрослых и стареющих листьях *L. sativa* содержание Фл было в 4 и 6 раз выше соответственно, чем в молодых листьях [24]. Это свидетельствовало об усилении синтеза ВМ с завершением активного роста листа. Полученные нами данные согласуются также с информацией о фотоингибировании биосинтеза Фл на ранней стадии развития волокна *Gossypium hirsutum* в культуре *in vitro*, в то же время стимулировании этого процесса – на более поздних стадиях [25]. Однако непропорциональное увеличение уровня Фл у стареющих листьев *L. chalconica* относительно увеличения интенсивности ПОЛ, вероятно, было обусловлено подключением к стабилизации окислительного статуса тканей других антиоксидантных метаболитов, например, Про.

Таблица 2. Ростовые характеристики разных линий каллусной культуры лихниса на 28 сутки субкультивирования (6 пассаж)

Линия	Возраст проростков, сут	Эксплант	Относительный прирост FW	Содержание DW, %	Обводненность, %
5Г	5	гипокотиль	8.67 ± 0.50 ^a	6.72 ± 0.18 ^d	93.28 ± 0.18 ^a
14СЛ	14	семядольный лист	4.36 ± 0.20 ^c	8.64 ± 0.15 ^a	91.36 ± 0.15 ^d
14ОП	14	основание побега	5.51 ± 0.26 ^b	7.32 ± 0.23 ^c	92.68 ± 0.23 ^b
14К	14	корень	4.23 ± 0.25 ^c	7.80 ± 0.22 ^b	92.20 ± 0.22 ^c

Примечание. Одинаковыми надстрочными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

Таблица 3. Содержание индивидуальных флавоноидов в разных линиях каллусной культуры лихниса на 28 сутки субкультивирования (6 пассаж)

Линия	Эксплант	Возраст проростков, сут	Содержание флавоноидов, мкг/г DW		
			рутин	кверцетин	дигидрокверцетин
5Г	гипокотиль	7	менее 0.01 ^c	менее 0.01 ^b	менее 0.01 ^c
14СЛ	семядоля	14	170.4 ± 24.7 ^b	менее 0.01 ^b	96.6 ± 14.5 ^b
14ОП	основание побега	14	333.7 ± 53.4 ^a	менее 0.01 ^b	1284.0 ± 115.0 ^a
14К	корень	14	394.5 ± 47.3 ^a	264.4 ± 39.7 ^a	менее 0.01 ^c

Примечание. Одинаковыми надстрочными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

Взаимосвязь уровня ВМ с интенсивностью ростовых процессов также показана на культуре *in vitro*. Суммарное содержание ФС у суспензионной культуры корня лихниса на 14 сутки субкультивирования соответствовало уровню этих соединений у каллусной культуры корня на 28 сутки (табл. 4). При относительно меньшем (на 30%) приросте сырой массы суспензионной культуры (4.7 ± 0.3) на 14 сутки относительно каллусной культуры (6.75 ± 0.41) на 28 сутки отмечалось более раннее увеличение содержания ФС.

В то же время сравнение содержания индивидуальных Фл в этих культурах показало снижение уровня КВ в более быстрорастущей суспензионной культуре (рис. 3). Нельзя исключить и высвобождение в питательную среду Фл, содержание которых предполагаем изучить в дальнейшем. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии КВ в регуляции роста суспензионной культуры. В соответствии с нашими более ранними исследованиями [26] показана зависимость конечного ростового индекса по сырой массе семядольной линии каллусной культуры *Saussurea orgaadayi* V. Khan. and Krasnob от суммарного содержания Фл. Максимальное 3.5-кратное увеличение конечного ростового индекса по сырой массе, отмеченное у каллусной культуры на питательной среде с 1 мкМ мета-хлорбензгидрилмочевины (индуктора монооксигеназной системы человека, ключевые ферменты которой относятся к суперсемейству цитохромов P-450 – CYP), происходило на фоне снижения суммы Фл на 83% [26]. Другими исследователями показано влияние Фл на регуляцию клеточного цикла [27, 28].

Самыми значимыми свойствами Фл как биологически важных активных компонентов считаются их антиоксидантные свойства и способность регулировать функции ферментов [29, 30]. Фл способны прямо или косвенно ослаблять или предупреждать клеточные повреждения, в том числе разрушение клеточных мембран, вызываемые свободными радикалами [30]. Фл могут осуществлять свой антиоксидантный эффект с помощью следующих механизмов: прямого сквенирования АФК и азота; редук-

ции альфа-токоферильных радикалов; активации антиоксидантных ферментов и/или низкомолекулярных антиоксидантов; хелатирования переходных металлов; ингибирования оксидаз. В зависимости от концентрации Фл и экзогенных факторов одни и те же Фл могут проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства. В свою очередь небольшая степень оксидативного стресса, индуцируемая некоторыми Фл, активирует антиоксидантную защиту организма путем стимулирования экспрессии генов антиоксидантных ферментов и таким образом усиливает процессы цитопротекции.

В соответствии с данными других авторов существует тесная взаимосвязь между химической структурой и антиоксидантной активностью Фл, что лежит в основе различий активности изученных индивидуальных Фл [31]. КВ является более эффективным антиоксидантом по сравнению с ДГКВ. Предполагают, что именно наличие двойной связи между 2 и 3 углеродами в С-кольце у КВ необходимо для проявления ингибирующей активности. Так же показано, что КВ сильнее ингибирует ПОЛ и обладает более высокой радикал-защитной способностью, чем Р [32].

Известно, что рост клеток растений контролируется гормонами, прежде всего ауксинами. С другой стороны, Фл регулируют транспорт индол-3-уксусной кислоты (ИУК) и ее метаболизм [8, 33], что может отразиться на ростовых процессах. Производные КВ являются ингибиторами базипетального транспорта ауксина, гравитропизма и роста корня удлинением.

Показана зависимость роста клеточной культуры и биосинтеза ВМ от природы ауксинов [34]. 2,4-Д активирует пролиферацию, но снижает синтез ВМ, тогда как НУК вызывает цитодифференцировку, приводящую к замедлению и остановке роста культуры, но активирует образование вторичных соединений.

В исследовании Vota и Deliu [35] показана зависимость флавоноидного пути от цитокининов (ЦК). Дефект передачи сигналов ЦК индуцировал экспрессию нескольких регуляторных генов, таких как *MYB11*, *MYB111*, *PRODUCTION*

Таблица 4. Относительный прирост сырой массы и содержание фенольных соединений (ФС) в каллусной и суспензионной культурах лихниса

Тип культуры	Время культивирования, сут	Относительный прирост FW	Содержание ФС, мг/г DW
Каллусная	28	6.75 ± 0.46^a	10.72 ± 0.20^a
Каллусная	35	5.54 ± 0.26^b	9.11 ± 0.32^b
Суспензионная	14	4.75 ± 0.35^c	11.40 ± 0.80^a

Примечание. Одинаковыми надстрочными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1 (PAP1/MYB75), PAP2/MYB90, TRANSPARENT TESTA GLABRA 2 (TTG2) и TT8, тем самым модулируя накопление флавонолов и антоцианов до и после стресса.

При выращивании клеточной культуры очень важно использовать оптимальное соотношение концентраций ауксинов и ЦК [34], поскольку ЦК в зависимости от природы и концентрации могут модулировать действие ауксинов.

В нашем эксперименте культуры *in vitro*, выращенные на МС-среде с 2 мг/л НУК и 0.5 мг/л 6-БАП, поддерживали активный рост и накопление Фл (табл. 4). Наши результаты согласуются с данными других авторов. Оценку эффективности соотношения ауксинов и ЦК для регуляции ВМ провели Liu и Saxena [36]. Авторы протестировали три ауксина (2,4-Д, ИУК, НУК) и один ЦК (БАП) в различных сочетаниях и концентрациях. Для всех вариантов отмечено увеличение количества Фл с возрастом суспензионных культур (14 дней субкультивирования). Наибольшая продукция Фл была достигнута в суспензионных культурах клеток *S. medusa* при использовании комбинации 2 мг/л НУК и 0.5 мг/л БАП [36]. Ауксины НУК и ИУК сильнее стимулировали биосинтез Фл, чем 2,4-Д. Увеличение концентрации ИУК и БАП значительно (в 3 раза) снижало количество Фл. Усиление продукции Фл показано также для суспензионной культуры *Digitalis lanata* после обработки 0.1 мг/л ИУК и 1 мг/л БАП [35], однако для другой линии этой культуры значимым была иная комбинация гормонов 0.1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. Нами ранее показано, что каллусная культура *S. orgadayi* двукратно увеличивала суммарное содержание эндогенных Фл при переходе от экспоненциального роста в стационарную фазу при субкультивировании на МС-среде, содержащей 0.8 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л БАП [26].

Другими авторами показано, что рост и выработка биологически активных соединений клеточной суспензионной культурой *Elaeocarpus grandiflorus* сильно зависели не только от типа, но и концентрации регуляторов роста [37]. Наибольшая продукция Фл была получена в культурах клеток, поддерживаемых на среде WPM (Woody Plant Medium) с добавлением 2.5 ppm 2,4-Д (1.575 мг КВ/г DW), а наименьшая – 3.5 ppm 2,4-Д. Показана видоспецифичность в накоплении Фл представителями одного и того же рода. Производство Фл культурой *E. grandiflorus* ниже, чем производство Фл культурой *S. burahol* [38]. На уровень Фл влияет и содержание их предшественников. Было обнаружено, что каллусные культуры *Anthocephalus indicus*, выращенные на среде WPM с добавлением 3 мг/л БАП и 100 мг/л фенилаланина, продуцировали 77.2 ± 1.92 и 104.4 ± 4.39 мг Фл/г сухой массы соответственно [39].

Опираясь на данные гормональной регуляции пролиферации клеток и содержания Фл, нами планируется изучение эндогенного уровня фитогормонов (ауксинов и цитокининов) и содержания Фл в культурах *L. chalconica in vitro* и питательных средах.

Таким образом, нами показано, что молодая каллусная культура *L. chalconica* способна синтезировать БАВ, содержащиеся как в побегах, так и в корне интактных растений. На уровень Фл влияет возраст растений, с которых отделены экспланты. Установлена органный специфика в накоплении Р, КВ и ДКВ. На примере культуры *in vitro* показана динамика трех Фл при получении суспензионной культуры из каллусной культуры.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что присутствие Фл в исследуемом элдистерон-содержащем виде *L. chalconica* делает его более перспективным для использования в качестве лекарственного сырья. Кроме того, каллусная и суспензионная культуры лихниса хальцедонского являются полноценным заменителем растений природной популяции по содержанию трех исследованных Фл.

Данная работа была поддержана Программой развития Томского государственного университета (Приоритет 2030).

Авторы выражают благодарность центру “Физико-химические методы анализа” Томского политехнического университета за помощь в количественном определении флавоноидов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 158 с.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
3. Jiang N., Doseff A., Grotewold E. Flavones: from biosynthesis to health benefits // *Plants*. 2016. V. 5. P. 27. <https://doi.org/10.3390/plants5020027>
4. Kumar V., Suman U., Rubal, Kumar S.Y. Flavonoid secondary metabolite: biosynthesis and role in growth and development in plants // *Recent trends and techniques in plant metabolic engineering* / Eds. S. Yadav, V. Kumar, S. Singh. Springer Singapore. 2018. P. 19. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2251-8_2
5. Kitamura S. Transport of flavonoids: from cytosolic synthesis to vacuolar accumulation // *The science of flavonoids* / Eds. E. Grotewold. Springer. 2006. P. 123. https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_5

6. Petruzza E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. Plant flavonoids – biosynthesis, transport and involvement in stress responses // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 14950. <https://doi.org/10.3390/ijms140714950>
7. Li Y., Kong D., Fu Y., Sussman M.R., Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2020. V. 148. P. 80. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
8. Falcone Ferreyra M.L., Rius S.P., Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
9. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* // *Физиология растений.* 1994. Т. 41. С. 873.
10. Зибарева Л.Н., Филоненко Е.С., Храмова Е.П. Флавоноиды некоторых видов растений родов *Lychnis* и *Silene* // *Фенольные соединения: функциональная роль в растениях. Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума “Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты”*, Москва, 2018. С. 274.
11. Нестерова Ю.В., Поветьева Т.Н., Зибарева Л.Н., Суслов Н.И., Зуева Е.П., Аксиненко С.Г., Афанасьева О.Г., Крылова С.Г., Амосова Е.Н., Рыбалкина О.Ю., Лопатина К.А. Противовоспалительная и анальгетическая активность комплекса флавоноидов *Lychnis chalconica* L. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017. Т. 163. № 2. С. 185.
12. Karnachuk R.A., Tishchenko S.Yu., Golovatskaya I.F. Endogenous phytohormones and regulation of morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* by blue light // *Russ. J. Plant Physiol.* 2001. V. 48. P. 226. <https://doi.org/10.1023/A:1009060302835>
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052>
14. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // *Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова.* Москва: Бином. 2011. С. 386.
15. Zagoskina N.V., Dubravina G.A., Alyavina A.K., Goncharuk E.A. Effect of ultraviolet (UV-B) radiation on the formation and localization of phenolic compounds in tea plant callus cultures // *Russ. J. Plant Physiol.* 2003. V. 50. P. 270. <https://doi.org/10.1023/A:1022945819389>
16. Ломбоева С.С., Танхаева Л.М., Оленников Д.Н. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) // *Химия растительного сырья.* 2008. № 2. С. 65.
17. Зимица Л.Н., Куркин В.А., Рыжов В.М. Исследование флавоноидного состава травы зверобоя пятилистного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Медицинский альманах.* 2012. Т. 2. С. 227. <https://doi.org/10.1023/A:1022945819389>
18. Шамц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига: Зинатне, 1988. 220 с.
19. Zhou X., Zeng M., Huang F., Qin G., Song Z. The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2023. V. 107. P. 4471. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12601-5>
20. Marín L., Gutiérrez-Del-Río I., Entrialgo-Cadierno R., Villar C.J., Lombó F. De novo biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor* // *PLoS One.* 2018. V. 13: e0207278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207278>.
21. Kojima E., Ohata S., Maruyama Y., Suzuki H., Shimozaka M., Taguchi G. Identification and characterization of a rhamnosyltransferase involved in rutin biosynthesis in *Fagopyrum esculentum* (common buckwheat) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2018. V. 82. P. 1790. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1491286>
22. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Meth. Enzymol.* 1978. V. 52. P. 302. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
23. Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. P. 205. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
24. Golovatskaya I.F., Boyko E.V., Vidarsphan A.N., Laptev N.I. Age-dependent morphophysiological changes and biochemical composition of *Lactuca sativa* L. plants influenced by se and solar radiation of varying intensity // *Agricultural Biology (Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya).* 2018. V. 53. P. 1025. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.5.1025eng>
25. Qian S., Hong L., Cai Y., Gao J., Lin Y. Effects of light on *in vitro* fiber development and flavonoid biosynthesis in green cotton (*Gossypium hirsutum*) // *Acta Soc. Bot. Pol.* 2016. V. 85. P. 3499. <https://doi.org/10.5586/asbp.3499>
26. Golovatskaya I.F., Reznichenko A.E., Laptev N.I. Influence of meta-chlorobenzhydryl urea on physiological and biochemical characteristics of *Saussurea orgaadayi* V. Khan. and Krasnob. cell culture // *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya].* 2021. V. 56. P. 602. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.602eng>
27. Galati G., Sabzevari O., Wilson J.X., O'Brien P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics // *Toxicology.* 2002. V. 177. P. 91. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00198-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00198-1).

28. Brunetti C., Di Ferdinando M., Fini A., Pollastri S., Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 3540. <https://doi.org/10.3390/ijms14023540>
29. Kato A., Nasu N., Takebayashi K., Adachi I., Minami Y., Sanae F., Asano N., Watson A.A., Nash R.J. Structure-activity relationships of flavonoids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 4469.
30. Zverev Ya.F. Flavonoids through the eyes of a pharmacologist, antioxidant and anti-inflammatory activities // *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* 2017. V. 15. P. 5. <https://doi.org/10.17816/RCF1545-13>
31. Sichel G., Corsaro C., Scalia M., Di Billo A.J., Bonomo R.P. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻ // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. V. 11. P. 1.
32. Dugas A.J., Castaneda-Acosta Jr.J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships // *J. Nat. Prod.* 2000. V. 63. P. 327. <https://doi.org/10.1021/np990352n>
33. Lewis D.R., Ramirez M.V., Miller N.D., Vallabhaneni P., Ray W.K., Helm R.F., Winkel B.S.J., Muday G.K. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 144. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172502>
34. Klyushin A.G., Tomilova S.V., Kochkin D.V., Galishev B.A., Nosov A.M. Effect of auxins and cytokinins on growth and biosynthetic characteristics of suspension cell culture of *Tribulus terrestris* L. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69: 52. <https://doi.org/10.1134/S1021443722020078>
35. Bota C., Deliu C. Original article effect of plant growth regulators on the production of flavonoids by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* // *Farmacia.* 2015. V. 63. P. 716.
36. Liu C.Z., Saxena P.K. *Saussurea medusa* cell suspension cultures for flavonoid production // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 547. P. 53.
37. Habibah N.A., Nugrahaningsih W.H., Anggraito Y.U., Mukhtar K., Wijayanti N., Mustafa F., Rostriana Y. Effect of growth regulators on cell growth and flavonoid production in cell culture of *Elaeocarpus grandiflorus* // *Annual Conference on Environmental Science, Society and its Application. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* Indonesia, 2019. V. 391. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/391/1/012061>
38. Habibah N., Moeljopawiro S., Dewi K., Indrianto A. Flavonoid production, growth and differentiation of *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook. F. and Th. cell suspension culture // *Pak. J. Biol. Sci.* 2017. V. 20. P. 197.
39. Indu S., Vijaya L., Meeta B., Jossy V., Naresh C. Production of flavonoids in callus culture of *Anthocephalus indicus* A. Rich. // *Asian J. Plant Sci.* 2013. V. 12. P. 40. <https://doi.org/10.3923/ajps.2013.40.45>

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОВЫШЕННОЙ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА¹

© 2024 г. Ю. В. Венжик^{a, *}, А. Н. Дерябин^a, К. В. Жукова^a, А. О. Соколов^a,
В. Н. Попов^a, И. Е. Мошков^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки

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

*e-mail: jul.venzhik@gmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2023 г.

После доработки 18.10.2023 г.

Принята к публикации 23.10.2023 г.

Возрастание климатической нестабильности наряду с усилением техногенной нагрузки на природную среду обуславливают необходимость поиска новых подходов к повышению устойчивости пшеницы к абиотическим факторам, прежде всего, к низкой температуре. Перспективным направлением является использование наночастиц металлов, которые в низких концентрациях обладают способностью позитивно влиять на метаболизм растений. Благодаря малым размерам (менее 100 нм), особым физико-химическим, оптическим и электрическим свойствам, наночастицы проникают через клеточные барьеры, распространяются по растительному организму, влияя практически на все процессы в нем. На примере пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Злата) впервые показано, что золотые наночастицы (ЗНЧ) способны действовать как адаптогены, повышая холодоустойчивость растений. В исследовании использовали прайминг (предпосевное замачивание на 24 ч) семян в растворах ЗНЧ (5–50 мкг/мл). Выросшие из обработанных ЗНЧ семян растения отличались от контрольных (необработанных) по ряду физиолого-биохимических и молекулярно-генетических показателей. У них были существенно усилены ростовые процессы и активность фотосинтетического аппарата, повышена экспрессия генов, кодирующих большую (*rbcL*) и малую (*rbcS*) субъединицы РБФК/О, а также *COR* генов – *Wcor726* и *Wcor15*. Более того, полученные из обработанных ЗНЧ семян растения пшеницы отличались от контрольных повышенной устойчивостью к низким температурам, причем эффект проявлялся как в контрольных условиях, так и после низкотемпературного закаливания. Концентрационные тесты показали, что максимальный эффект достигался при использовании ЗНЧ в концентрации 10 мкг/мл. Сделан вывод, что ЗНЧ способны влиять на метаболизм растений и экспрессию генов стрессового ответа, что приводит к существенному увеличению холодоустойчивости. Обсуждаются возможные механизмы действия ЗНЧ на устойчивость к низкой температуре.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, гены РБФК/О, золотые наночастицы, растворимые сахара, рост, фотосинтетический аппарат, холодоустойчивость, *COR* гены

DOI: 10.31857/S0015330324030081, EDN: NMJTVI

ВВЕДЕНИЕ

Исследование физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов адаптации высших растений к абиотическим факторам среды является одной из центральных задач современной биологии. Яровая пшеница – одна из важнейших сельскохозяйственных культур, повсеместно возделываемая на территории России

и широко востребованная во всем мире. Возрастание климатической нестабильности наряду с усилением техногенной нагрузки на природную среду обуславливают необходимость поиска новых подходов к повышению устойчивости пшеницы к абиотическим факторам, прежде всего, к низкой температуре. Перспективным направлением является использование наночастиц (НЧ) металлов, которые в низких концентрациях обладают способностью позитивно влиять на метаболизм и стрессоустойчивость растений. Благодаря малым размерам (менее 100 нм), высокой подвижности, реакционной и адсорбционной

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324030081

Сокращения: ЗНЧ – золотые наночастицы, НЧ – наночастицы, ФСА – фотосинтетический аппарат.

способности, а также уникальным оптическим резонансным свойствам НЧ проникают через клеточные барьеры, распространяются по растительному организму, влияя практически на все процессы в нем [1]. На сегодняшний день НЧ находят все большее применение в биологии, медицине и сельском хозяйстве как регуляторы роста и развития растений, компоненты лекарственных препаратов, вещества с гербицидной/пестицидной активностью и нанодоброения [2].

Особое место среди металлических НЧ занимают золотые наночастицы (ЗНЧ). С одной стороны, ЗНЧ быстро и легко синтезируются из недорогих химических реактивов [3, 4]. С другой стороны, ЗНЧ, как правило, нетоксичны для растений, животных и людей при использовании в микродозах до 100 мкг/мл [5]. Анализ литературных источников демонстрирует, что эффекты ЗНЧ на растения носят преимущественно позитивный характер [3, 4]. Повышение интенсивности ростовых процессов под влиянием ЗНЧ наблюдали на целом ряде растительных объектов [6–11]. Под воздействием ЗНЧ отмечено усиление интенсивности фотосинтеза и изменения параметров флуоресценции хлорофилла [11, 12], содержания фотосинтетических пигментов [6, 10, 11] и ультраструктуры хлоропластов [10, 13]. Наличие уникальных оптических свойств, связанных с возбуждением локализованных плазмонных резонансов при взаимодействии со светом, обуславливает мировой научный интерес к применению ЗНЧ в медицине, биологии и сельском хозяйстве в качестве фотопротекторов, снижающих риски развития окислительного стресса [3, 5].

В последние годы возрос интерес к ЗНЧ как к адаптогенам, способным повышать стрессоустойчивость. В отношении растений такого рода исследования немногочисленны, а механизмы эффектов ЗНЧ на метаболизм и устойчивость растений остаются не совсем ясными. Показано на ячмене и резуховидке, что ЗНЧ, проникая в растения через корни, изменяли экспрессию генов *DGR1* и *DGR2*, кодирующих белки клеточной стенки [14], а также ее химический состав и жесткость, способствуя повышению стрессоустойчивости [15]. Корневая обработка растений риса нанокompозитами, содержащими ЗНЧ, снижала токсический эффект ионов Cd, препятствуя их абсорбции клетками корней и нивелируя риски развития окислительного стресса [16, 17]. В условиях засоления ЗНЧ, нанесенные на листья пшеницы, поддерживали ионный баланс, модулировали образование NO как сигнальной молекулы и регулятора многих процессов в организме, повышали активность антиоксидантных ферментов [18]. Исследования в отношении влияния ЗНЧ на устойчивость растений к низким температурам фрагментарны, однако перспек-

тивы дальнейшего использования ЗНЧ в этом направлении вполне очевидны.

Цель работы — изучить влияние ЗНЧ на холодоустойчивость яровой пшеницы и ряд физиолого-биохимических и молекулярно-генетических показателей, свидетельствующих о ее формировании, таких как интенсивность ростовых процессов, активность фотосинтетического аппарата (ФСА), интенсивность темного дыхания, содержание в листьях растворимых сахаров и уровень экспрессии некоторых фотосинтетических и COR генов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Схема эксперимента. Экспериментальная работа проводилась по следующей схеме (рис. 1). В качестве способа обработки растений растворами ЗНЧ мы выбрали нанопрайминг (замачивание семян) в течение 24 ч. Нанопрайминг считается простой, эффективной, рентабельной и экологически безопасной стратегией работы с НЧ [2]. Основываясь на литературных данных о том, что ЗНЧ в концентрациях до 50 мкг/мл чаще всего оказывают стимулирующий эффект на растительный организм [5, 14], мы использовали растворы с концентрациями ЗНЧ от 5 до 50 мкг/мл. После процедуры нанопрайминга семена проращивали в контролируемых условиях до достижения проростками возраста 10 сут. Затем часть растений из каждой группы отбирали и закачивали при температуре 4°C в течение 7 сут. Холодоустойчивость незакаленных и закаленных растений оценивали методом прямого промораживания. Основные физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы влияния ЗНЧ на растения пшеницы изучали, используя вариант с концентрацией ЗНЧ, показавший максимальный стимулирующий эффект на устойчивость к промораживанию.

Синтез ЗНЧ. Золотые наносферы получены цитратным методом [4] в реакции восстановления золотохлористоводородной кислоты (Sigma-Aldrich, США) цитратом натрия (Fluka, Швейцария). Восстановление проводили путем нагревания 250 мл 0.01% водного раствора золотохлористоводородной кислоты в колбе Эрленмейера на магнитной мешалке с обратным водяным холодильником до 100°C и последующего добавления 7.75 мл 1% водного раствора цитрата натрия. Кипячение продолжали в течение 30 мин до образования золя красного цвета. Свежеприготовленные растворы разливали в стерильные стеклянные флаконы с плотно закрывающимися крышками и хранили при температуре 4°C.

Полученные ЗНЧ были охарактеризованы методами трансмиссионной электронной микроскопии, спектрофотометрии и динамического светорассеяния [19]. По данным измерений,



Рис. 1. Схема эксперимента. ЗНЧ – золотые наночастицы.

средний диаметр ЗНЧ составил 15.3 нм, число НЧ в 1 мл – 1.6×10^{12} . Максимальная концентрация золота в растворе составила 57 мкг/мл. В опытах использовали растворы с концентрациями ЗНЧ 5, 10, 20 и 50 мкг/мл, полученные путем разбавления исходного раствора дистиллированной водой непосредственно перед применением. В качестве контрольного варианта использовали растения, выращенные из семян, обработанных дистиллированной водой (концентрация ЗНЧ 0 мкг/мл).

Растительный материал и условия выращивания. Прайминг семян яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Злата (Федеральный исследовательский центр “Немчиновка”, Россия) проводили в растворах ЗНЧ в течение 24 ч. Далее семена (400 шт./вариант) проращивали на дистиллированной воде при 22°C, относительной влажности воздуха 60–70%, освещенности 100 мкмоль/(м²с) и 16-часовом фотопериоде.

Низкотемпературное закаливание растений. Через 10 сут. половину растений из каждого варианта закаливали в климатической камере KBW-240 (Binder, Германия) при температуре 4°C в течение 7 сут, сохраняя прочие условия неизменными.

Устойчивость к низким температурам. Устойчивость закаленных и незакаленных растений пшеницы к низкой температуре оценивали ме-

тодом прямого промораживания. Из каждого варианта опыта брали по 30 растений и последовательно промораживали их в бумажных конвертах при температурах –3 и –5°C в течение 24 ч в климатической камере MIR-153 (Sanyo, Япония). Затем растения в течение 24 ч выдерживали при температуре 4°C в темноте, после чего переносили в обычные условия (22°C, дневной свет) на 72 ч. Об устойчивости к низким температурам судили по количеству неповрежденных проростков в процентах от общего числа промороженных растений.

Содержание золота. Определение содержания золота в семенах, корнях и листьях 10-дневных проростков пшеницы проводили на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Agilent (Agilent Technologies, США) и масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Bruker 820-MS ICP-MS (Bruker, Германия).

Ростовые параметры. Длину первого листа у проростков измеряли на 10 и 17 сутки выращивания, т.е. до и после низкотемпературного закаливания.

Интенсивность CO₂ газообмена. Скорость видимой ассимиляции CO₂ и темного дыхания у растений пшеницы определяли при 22 и 4°C, используя установку открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (Hartmann &

Braun, Германия), и выражали в мг $\text{CO}_2/\text{г}$ сухой массы в ч.

Содержание фотосинтетических пигментов. Концентрацию хлорофилла *a* (Хл *a*), хлорофилла *b* (Хл *b*) и каротиноидов (Кар) в листьях определяли с помощью спектрофотометра Genesys 10 UV (Termo Electron Corporation, США) при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов в 80% растворе ацетона – 663, 646 и 470 нм соответственно [20]. Содержание пигментов выражали в мг/г сухой массы листьев.

Долю хлорофиллов в светособирающем комплексе (ССК) рассчитывали по формуле: $\text{ССК} (\%) = (\text{Хл } b + 1.2 \times \text{Хл } b) / (\text{Хл } a + \text{Хл } b) \times 100$, исходя из того, что весь Хл *b* находится в ССК, а соотношение Хл *a*/Хл *b* в нем равно 1.2.

Содержание сухого вещества в листьях. Интенсивность накопления сухой биомассы листьев высчитывали в процентах от сырого веса после высушивания образцов в термостате при температуре 100–105°C до постоянного веса.

Содержание растворимых сахаров. Для оценки содержания глюкозы в листьях использовали набор Глюкоза-Ольвекс (ООО “Ольвекс диагностика”, Россия). Содержание сахарозы и фруктозы в листьях определяли методом Рое [21]. Содержание сахаров выражали в мг/г сухой массы листьев.

Выделение РНК и проведение ПЦР-РВ (qRT-PCR). Тотальную РНК выделяли из навески листьев (50 мг), используя набор Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, США) с модификацией стадии гомогенизации. Качество и количество очищенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) и анализировали электрофоретически в 2% агарозном геле. Для удаления остаточных примесей геномной ДНК препараты тотальной РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Для синтеза кДНК использовали наборы для обратной транскрипции RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США), в том числе с входящими в состав праймерами *oligo (dT) 21* для генов ядерного кодирования и *random 6* для генов хлоропластного кодирования [22].

ПЦР-РВ (RT-qPCR) проводили на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США), используя интеркалирующий краситель SYBR Green I (ЗАО “Евроген”, Россия). Реакционная смесь для количественной ПЦР в объеме 25 мкл содержала 5 мкл qPCRmix HS SYBR (ЗАО “Евроген”, Россия), 0.2 мкмоль каждого праймера и 15 нг матрицы кДНК. Использовали следующие условия амплификации: 95°C – 5 мин, далее 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 30 с и 72°C – 30 с.

Для амплификации целевых (*Wcor726*, *Wcor15*) и референсного (*TaRP15*) генов были подобраны праймеры с использованием онлайн-ресур-

сов Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и OligoAnalyzer™ Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Нуклеотидные последовательности праймеров для амплификации целевых генов малой (*rbcS*) и большой (*rbcL*) субъединиц РБФК/О и референсного гена *TaAct7* (актин) были заимствованы из публикаций [23, 24]. Используемые праймеры представлены в таблице S1 (Дополнительные материалы).

Уровни экспрессии мРНК генов-мишеней нормализовали по отношению к гену *TaAct7* и *TaRP15* (RNA polymerase I, II, III; 15 кД). Результаты амплификации обрабатывали методом Pfaffl [25].

Статистический анализ. Все эксперименты проводили в 3–6 биологических и 3–4 аналитических повторностях. В таблицах и на графиках представлены среднеарифметические значения и их стандартные ошибки. Статистическую значимость различий между средними значениями оценивали с помощью ANOVA (применяли критерий Тьюки), встроенного в графический математический пакет Microcal Origin. В статье обсуждаются только величины, статистически значимые при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ЗНЧ на холодоустойчивость

На первом этапе исследования была проведена оценка влияния различных концентраций ЗНЧ (5–50 мкг/мл) на холодоустойчивость к низкой температуре незакаленных и закаленных (4°C, 7 сут) проростков пшеницы. Для этого применили метод прямого промораживания, основанный на определении выживаемости растений после тестирующего действия низких температур (–3 и –5°C) в течение 24 ч.

Установлено, что нанопрайминг семян увеличивал холодоустойчивость как незакаленных, так и закаленных проростков пшеницы (табл. 1). У незакаленных растений ЗНЧ в концентрациях 5 и 10 мкг/мл вызывали 2–3-кратное увеличение холодоустойчивости после промораживания при температуре –3°C. При этом максимальный положительный эффект на холодоустойчивость отмечен при использовании ЗНЧ в концентрации 10 мкг/мл (рис. 2а, б). Снижение температуры промораживания до –5°C вызывало гибель незакаленных растений независимо от варианта опыта.

Низкотемпературное закаливание приводило к увеличению холодоустойчивости пшеницы. Так, если выживаемость незакаленных растений после промораживания при температуре –3°C составляла 15%, то после закаливания она увеличивалась в 4 раза (табл. 1). При этом обработка ЗНЧ во всех использованных концентра-

циях вызывала у растений дополнительный (на 30–40%) прирост холодоустойчивости. Важно отметить, что в отличие от незакаленных растений, у проростков пшеницы, подвергнутых низ-

котемпературному закаливанию, эффект ЗНЧ сохранялся при снижении температуры до -5°C и был максимальным для концентрации ЗНЧ 10 мкг/мл (рис. 3а, б).

Таблица 1. Влияние золотых наночастиц (ЗНЧ) на холодоустойчивость незакаленных и закаленных (4°C , 7 сут.) проростков пшеницы после промораживания, %

Концентрация ЗНЧ (мкг/мл)	Температура промораживания	
	-3°C	-5°C
Незакаленные проростки		
0	15 ± 3	0
5	$30 \pm 5^*$	0
10	$50 \pm 5^*$	0
20	10 ± 3	0
50	10 ± 3	0
Закаленные проростки		
0	60 ± 3	7 ± 3
5	$90 \pm 3^*$	$50 \pm 3^*$
10	$97 \pm 3^*$	$67 \pm 3^*$
20	$90 \pm 3^*$	$50 \pm 3^*$
50	$90 \pm 3^*$	$50 \pm 3^*$

Примечание. Устойчивость пшеницы к низкой температуре определяли по выживаемости (%) после промораживания при температуре -3 и -5°C в течение 24 ч. * – статистически значимые при $P < 0.05$ отличия обработанных ЗНЧ растений от варианта 0 (необработанные растения).

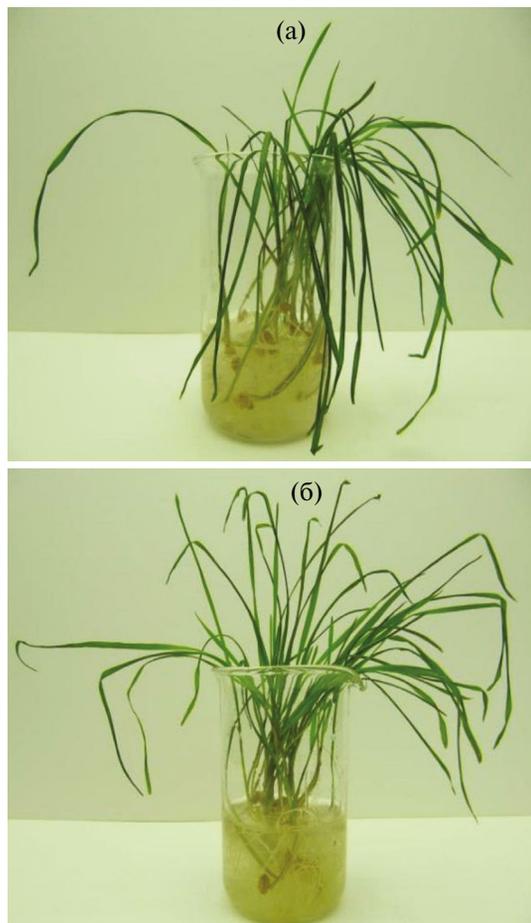


Рис. 2. Незакаленные проростки пшеницы после промораживания при температуре -3°C в течение 24 ч: а – контроль, б – проростки, обработанные ЗНЧ в концентрации 10 мкг/мл.



Рис. 3. Закаленные (4°C , 7 сут.) проростки пшеницы после промораживания при -5°C в течение 24 ч: а – контроль, б – проростки, обработанные ЗНЧ в концентрации 10 мкг/мл.

Поскольку концентрация ЗНЧ 10 мкг/мл оказывала максимальный эффект на холодоустойчивость как незакаленных, так и закаленных растений пшеницы, именно эта концентрация была отобрана для дальнейшего изучения физиолого-биохимических и молекулярно-генетических показателей, важных для формирования повышенной устойчивости растений к низкой температуре.

Содержание золота

Следующим этапом исследования было определение содержания золота в семенах (после нанопрайминга), а также в корнях и листьях 10-дневных растений пшеницы, выращенных из семян, обработанных ЗНЧ (10 мкг/мл). Данные о содержании золота в семенах и органах растений представлены в таблице 2. Установлено, что наибольшее количество золота содержали семена; более того, оно было обнаружено в корнях и даже (в следовых количествах) в листьях растений, выращенных из обработанных ЗНЧ семян (табл. 2).

Таблица 2. Содержание золота в семенах, корнях и листьях пшеницы после нанопрайминга золотыми наночастицами

Объект	Золото, мг/кг сухой массы
Семена	3.9 ± 0.2
Корни	1.6 ± 0.1
Листья	0.28 ± 0.01

Влияние ЗНЧ на ростовые параметры

Одним из важнейших интегральных показателей, отражающих состояние растительного организма в условиях длительного действия низкой температуры, является рост. Проведенные опыты показали, что в варианте с обработкой ЗНЧ (10 мкг/мл) наблюдалось увеличение длины первого листа у незакаленных проростков пшеницы (рис. 4а). В условиях низкотемпературного закаливания рост листьев практически полностью прекращался, причем как у проростков, выращенных из необработанных семян, так и у тех, семена которых были обработаны ЗНЧ (рис. 4б).

Влияние ЗНЧ на интенсивность CO_2 -газообмена

Важным этапом исследования было определение эффектов ЗНЧ на интенсивность CO_2 -газообмена у пшеницы. Установлено, что обработка ЗНЧ существенно увеличивала интенсивность видимой ассимиляции CO_2 не-

закаленных проростков (рис. 4в). В условиях низкотемпературного закаливания интенсивность видимой ассимиляции CO_2 снижалась почти в 2 раза, но достоверных различий по этому показателю между контрольными и обработанными ЗНЧ растениями не обнаружено (рис. 4г). Следует отметить, что в варианте с обработкой ЗНЧ в условиях закаливания интенсивность видимой ассимиляции CO_2 была немного выше, чем в контрольном варианте. Достоверных эффектов ЗНЧ на интенсивность темнового дыхания не обнаружено, но она снижалась в период закаливания в обоих вариантах опыта (у обработанных и необработанных ЗНЧ проростков) почти в 3 раза (рис. 4д, е).

Влияние ЗНЧ на содержание фотосинтетических пигментов

Под влиянием ЗНЧ в контрольных условиях существенно увеличивалось содержание хлорофиллов в листьях пшеницы (табл. 3), при этом содержание каротиноидов и доля хлорофиллов в ССК не изменялись. У закаленных проростков пшеницы содержание хлорофиллов было меньше, при этом достоверных изменений между вариантами в содержании фотосинтетических пигментов не обнаружено (табл. 3).

Таблица 3. Влияние золотых наночастиц (ЗНЧ) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях пшеницы до и после низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут)

Показатели	Концентрация ЗНЧ (мкг/мл)	
	0	10
Незакаленные проростки		
Хл $a + b$, мг/г сухой массы	14.6 ± 0.1	$15.7 \pm 0.2^*$
Каротиноиды, мг/г сухой массы	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Хлорофилл в ССК, %	53 ± 1	50 ± 1
Закаленные проростки		
Хл $a + b$, мг/г сухой массы	11.2 ± 0.3	11.3 ± 0.3
Каротиноиды, мг/г сухой массы	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Хлорофилл в ССК, %	48 ± 1	47 ± 1

Примечание. * – Статистически значимые при $P < 0.05$ отличия обработанных ЗНЧ растений от варианта 0 (необработанные растения).

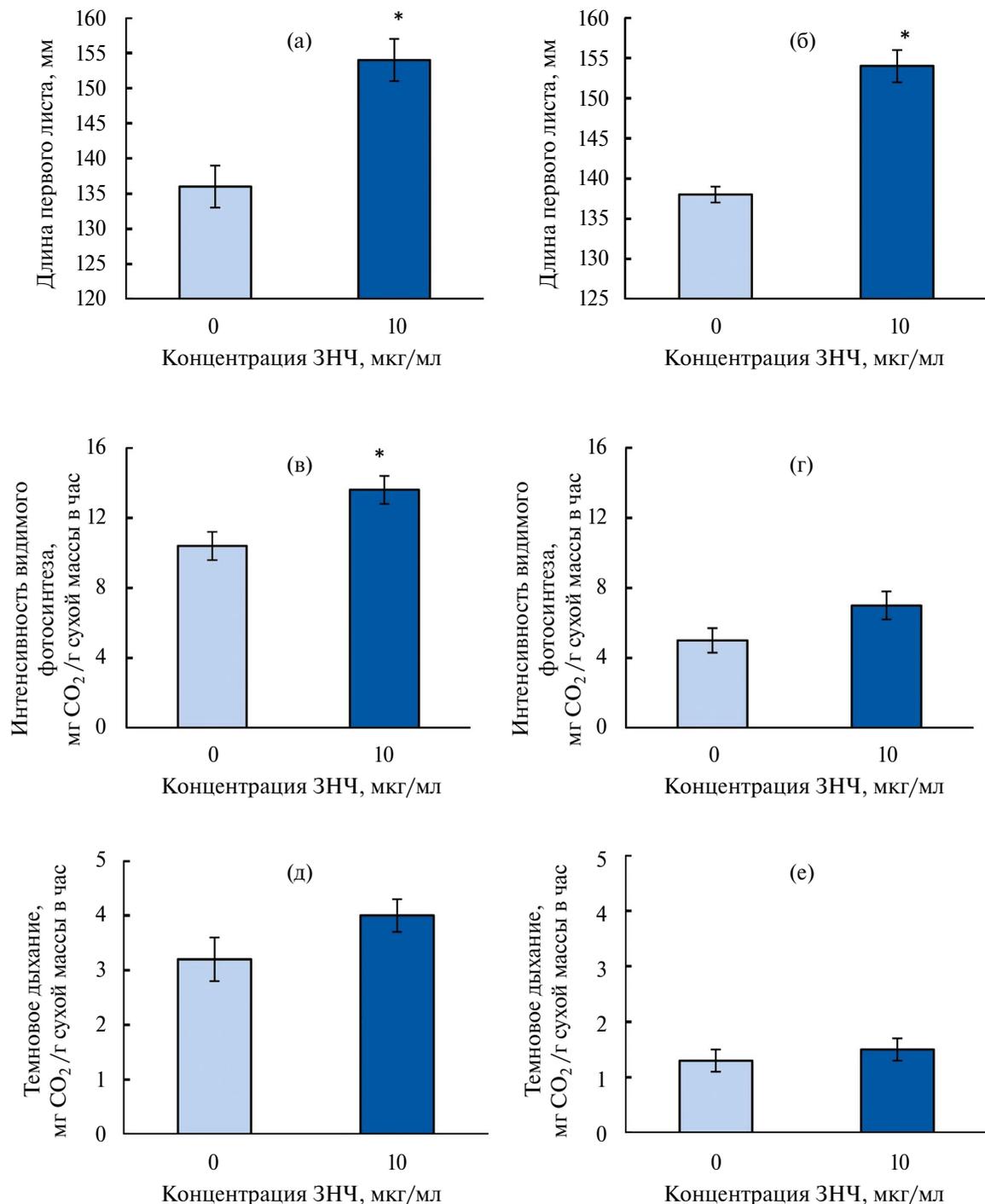


Рис. 4. Влияние золотых наночастиц (ЗНЧ) на ростовые параметры (а, б), интенсивность видимого фотосинтеза (в, г) и темнового дыхания (д, е) пшеницы до (а, в, д) и после (б, г, е) низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут). * – Статистически значимые при $P < 0.05$ отличия обработанных ЗНЧ растений от варианта 0 (необработанные растения).

Влияние ЗНЧ на накопление сухого вещества и сахаров

Исследования показали, что нанопрайминг семян ЗНЧ не влиял на накопление сухой биомассы побегов пшеницы (табл. 4). Кроме того, в их листьях содержание моносахаров (глюкоза, фруктоза) было ниже, а накопление сахарозы – выше, чем в контрольном (без нанопрайминга) варианте (табл. 4). По суммарному содержанию

этих сахаров обработанные ЗНЧ растения не отличались от контрольных.

После низкотемпературного закаливания содержание сухого вещества в листьях пшеницы возрастало на треть, а обработка ЗНЧ дополнительно стимулировала этот процесс (табл. 4). При этом под влиянием ЗНЧ наблюдали усиленное накопление закаленными растениями фруктозы и сахарозы.

Таблица 4. Влияние золотых наночастиц (ЗНЧ) на сухую биомассу побегов и содержание сахаров в листьях пшеницы до и после низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут.)

Показатели	Концентрация ЗНЧ (мкг/мл)	
	0	10
Незакаленные проростки		
Сухой вес побегов	13.2 ± 0.2	13.3 ± 0.2
Глюкоза (мг/г сухой массы)	49.9 ± 1.2	38.9 ± 1.5*
Фруктоза (мг/г сухой массы)	5.2 ± 0.5	3.8 ± 0.6*
Сахароза (мг/г сухой массы)	4.4 ± 0.2	7.6 ± 0.2*
Закаленные проростки		
Сухой вес побегов	17.8 ± 0.3	19.1 ± 0.4*
Глюкоза (мг/г сухой массы)	37.1 ± 1.2	33.3 ± 1.3
Фруктоза (мг/г сухой массы)	8.0 ± 0.5	10.9 ± 0.6*
Сахароза (мг/г сухой массы)	14.1 ± 0.2	24.5 ± 0.2*

Примечание. * – Статистически значимые при $P < 0.05$ отлечения обработанных ЗНЧ растений от варианта 0 (необработанные растения).

Влияние ЗНЧ на уровень экспрессии генов ФСА

Мы проанализировали влияние ЗНЧ на уровень экспрессии генов ФСА – *rbcS* и *rbcL*, кодирующих, соответственно, малую и большую субъединицы РБФК/О. Установлено, что у растений, обработанных ЗНЧ, был увеличен уровень экспрессии *rbcS* и *rbcL* (по сравнению с растениями, необработанными ЗНЧ) в контрольных условиях (рис. 5а, б). Достоверных эффектов ЗНЧ на уровень экспрессии этих генов в условиях низкотемпературного закаливания не обнаружено (рис. 5в, г).

Влияние ЗНЧ на уровень экспрессии COR генов

Нами проведена оценка влияния ЗНЧ на уровень экспрессии COR генов – *Wcor726* и *Wcor15*, кодирующих защитные белки, играющие важную роль в формировании повышенной холодоустойчивости. Показано, что в листьях незакаленных растений уровень экспрессии гена *Wcor15* под влиянием ЗНЧ повышался в 8 раз (рис. 6в), тогда как уровень экспрессии гена *Wcor726* не изменялся (рис. 6а). В условиях низкотемпературного закаливания обработка ЗНЧ не влияла на уровень экспрессии изученных генов (рис. 6б, г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение механизмов стрессоустойчивости важных сельскохозяйственных культур, как и поиск инновационных подходов к проблеме ее повышения, относятся к наиболее актуальным проблемам современной биологии. Яровая пшеница – холодостойкая культура, способная выдерживать непродолжительное действие отрицательных околонулевых температур. Более того, в процессе низкотемпературного закаливания многие сорта пшеницы могут развивать комплекс адаптивных реакций и механизмов, позволяющих им переносить более низкие отрицательные температуры. Поэтому при изучении эффектов ЗНЧ на холодоустойчивость пшеницы важно рассматривать их влияние как в контрольных условиях (на незакаленных растениях), так и после низкотемпературного закаливания. Более того, большое значение имеют такие факторы как способ внесения НЧ в растительный организм и используемая концентрация НЧ.

Известно, что НЧ могут поступать в растения через корни, листья или семена. Предполагают, что в корневую систему НЧ попадают вместе с поглощаемой водой через боковые корни и корневые волоски. Основным способом проникновения НЧ в листья считают устьица [2]. Видимо, благодаря своей амфифильности, НЧ “просачиваются” через липофильный кутикулярный слой или разрушают восковый слой кутикулы и проникают в лист. Оказавшись внутри растения, НЧ могут перемещаться по ксилеме и флоэме, а также накапливаться в клетках [2]. В наших опытах был использован метод нанопрайминга – семена пшеницы замачивали в растворах ЗНЧ различных концентраций. Этот способ обработки НЧ широко применяется в экспериментах с растениями и считается наиболее рентабельным и безопасным [26]. При нанопрайминге НЧ проникают внутрь семян пассивно с молекулами воды и через разрушенные участки семенной оболочки. Механизм дальнейшей “работы” НЧ в растительном организме не совсем ясен. В ряде исследований установлено, что ЗНЧ не просто адсорбируются в семенных оболочках, но и перемещаются в проростки и распространяются по тканям, проникая в клетки. Например, методами флуоресцентной микроскопии и оптической эмиссионной спектроскопии показано, что ЗНЧ содержались не только в семенах, но и в листьях проростков, выращенных из семян, обработанных ЗНЧ [10, 27]. В наших опытах методами атомно-эмиссионной и масс-спектроскопии золото также было обнаружено не только в семенах, но и в корнях, а также (в следовых количествах) в листьях растений пшеницы, выращенных из обработанных ЗНЧ семян (табл. 2). Важно отметить, что эти растения не только отличались от

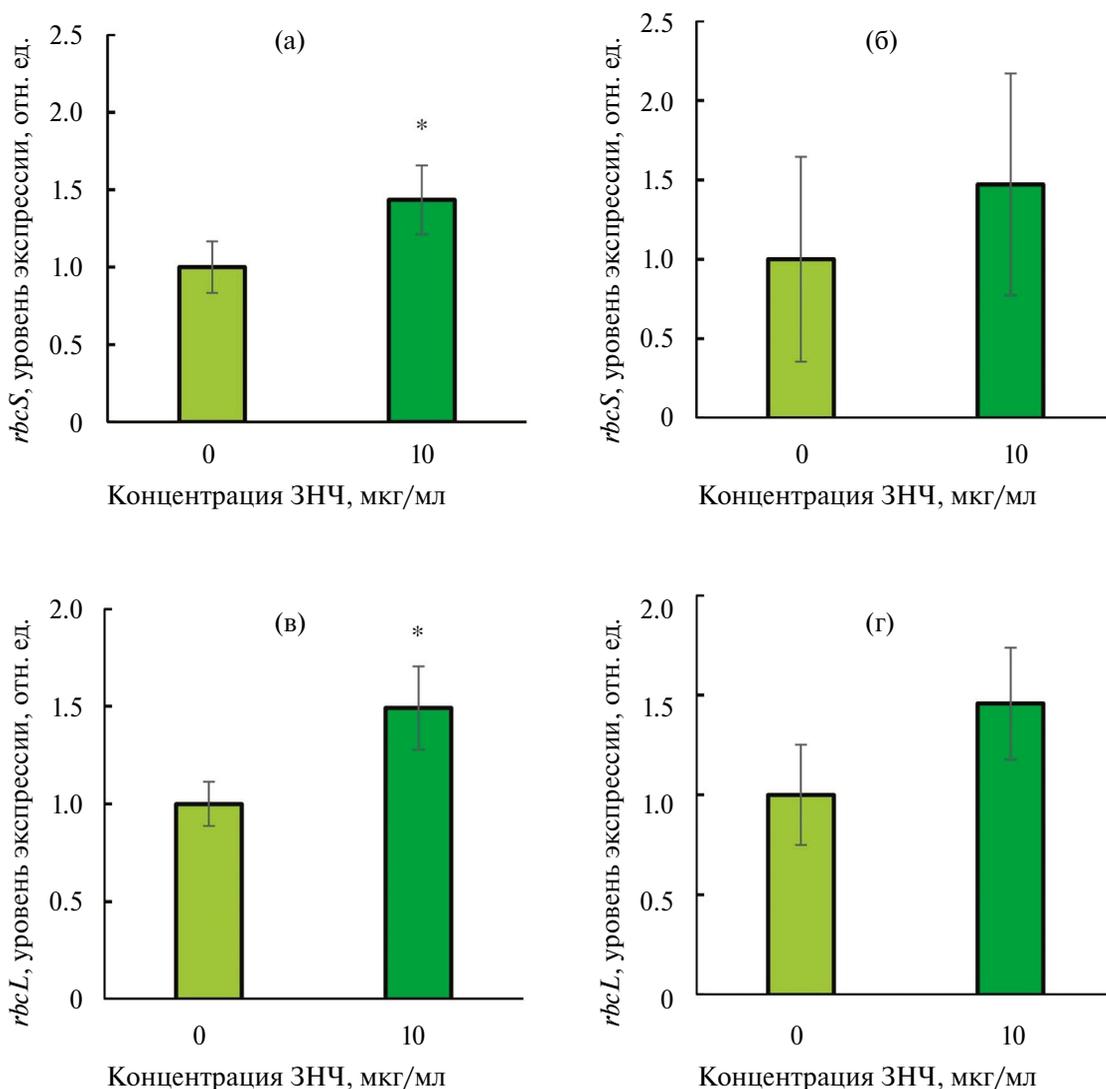


Рис. 5. Влияние золотых наночастиц (ЗНЧ) на экспрессию генов *rbcS* и *rbcL* в листьях пшеницы до (а, в) и после (б, г) низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут.). * – Статистически значимые при $P < 0.05$ отличия обработанных ЗНЧ растений от варианта 0 (необработанные растения).

контрольных (необработанных) по ряду физиолого-биохимических и молекулярно-генетических показателей, но и развивали повышенную устойчивость к низким температурам (табл. 2). В результате проведенных нами концентрационных тестов с применением ЗНЧ установлено, что максимальный эффект на холодоустойчивость растений достигался при использовании очень низкой концентрации – 10 мкг/мл. Поэтому в последующих экспериментах по изучению механизмов стресспротекторного влияния ЗНЧ на растения пшеницы была использована именно эта концентрация.

Наши исследования показали, что растения пшеницы, выращенные в оптимальных условиях из семян, обработанных ЗНЧ, отличались от контрольных повышенной интенсивностью роста и активностью ФСА, более высоким содержанием хлорофиллов в листьях, а также повышенным уровнем экспрессии генов, кодирующих

большую и малую субъединицы РБФК/О (рис. 4, 5; табл. 3). Схожие результаты по стимулирующему влиянию низких концентраций ЗНЧ на рост растений были получены на кукурузе, ружовидке и горчице [6–8, 10]. Стимулирующее действие НЧ на ростовые процессы связывают с их способностью улучшать поглощение воды и питательных элементов, предположительно, за счет активации генов, регулирующих работу аквапоринов, и генов, ответственных за клеточный цикл [28]. Показано, что под влиянием ЗНЧ изменялся химический состав клеточной стенки в корнях ячменя, в частности, увеличивалось количество белков-галактанов, вследствие чего возрастала жесткость клеточной стенки, а следовательно, стрессоустойчивость растений [14, 15]. Кроме того, ЗНЧ влияли на гены *DGR1* и *DGR2*, кодирующие белки клеточной стенки, участвующие в удлинении корней [14]. Показано влияние ЗНЧ на дифференцировку клеток через

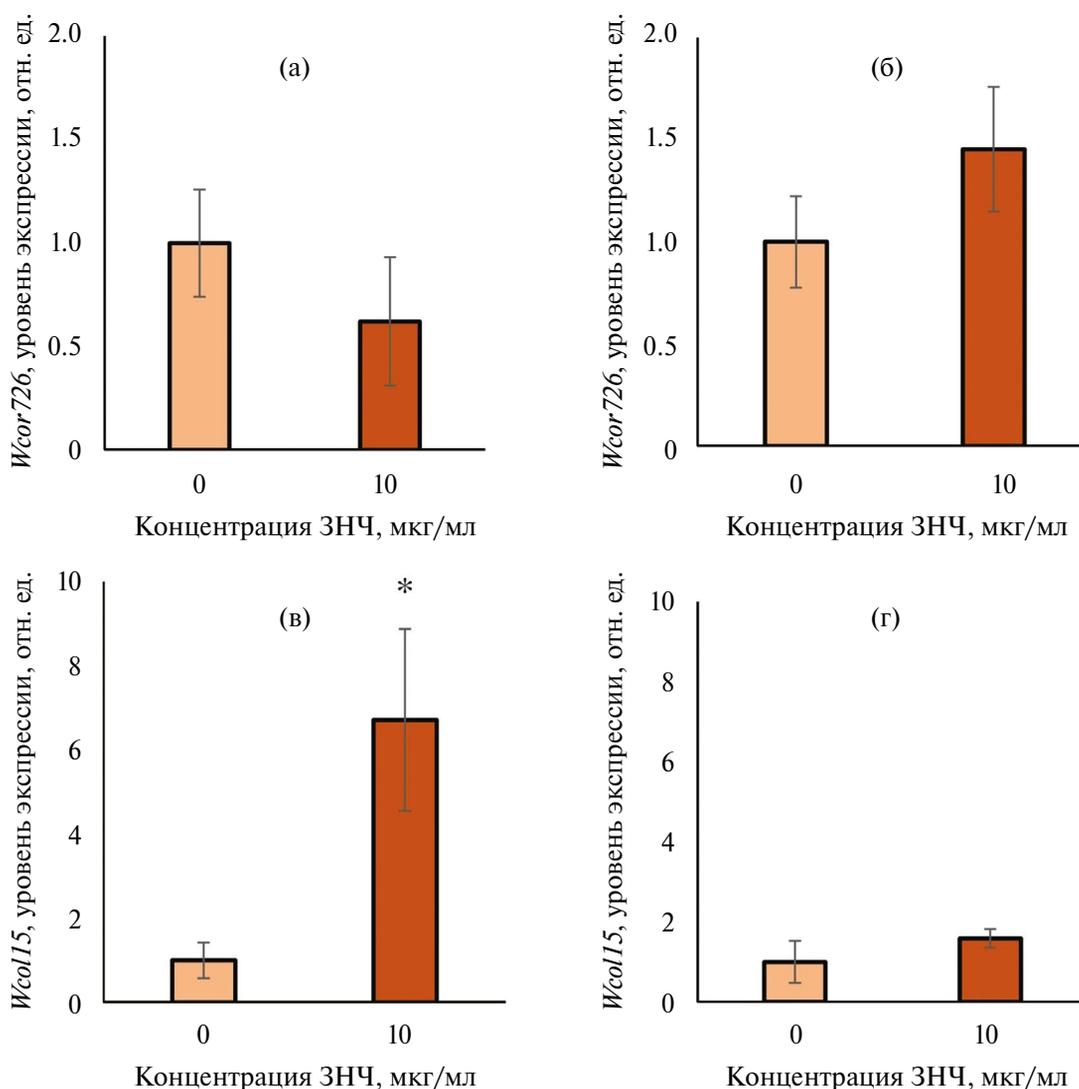


Рис. 6. Влияние золотых наночастиц (ЗНЧ) на экспрессию *Wcor726* и *Wcor15* генов в листьях пшеницы до (а, в) и после (б, г) низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут.). * – Статистически значимые при $P < 0.05$ отличия обработанных ЗНЧ растений от варианта 0 (необработанные растения).

микроРНК – малые некодирующие РНК, контролирующие, в том числе, рост растения и его стрессовый ответ [7].

В ряде исследований отмечено увеличение интенсивности фотосинтеза и содержания хлорофиллов под влиянием ЗНЧ [6, 10, 11]. Установлено, что другие НЧ также изменяют интенсивность синтеза фотосинтетических пигментов и активность ФСА посредством регуляции экспрессии генов, задействованных в его работе. Например, НЧ оксида цинка повышали экспрессию генов, кодирующих структурные единицы фотосистем (*PSAD2*, *PSAE2*, *PSAK*) и генов синтеза фотосинтетических пигментов (*CAO*, *CHLG*, *GGPS6*, *PSY*, *PDS*, *ZDS*) [29]. НЧ оксида кремния усиливали экспрессию генов *PsbH*, *PsbB* и *PsbD*, кодирующих белки сборки ФС II [23]. НЧ оксида титана усиливали экспрессию генов, участвующих в синтезе РБФК/О [30].

Наши исследования показали, что в условиях низкотемпературного закаливания ЗНЧ вызывали дополнительный прирост холодоустойчивости проростков пшеницы (табл. 1). Однако эффекты ЗНЧ на ростовые процессы и активность ФСА практически полностью нивелировались действием низкой закалывающей температуры. При этом процесс повышения холодоустойчивости сопровождался существенным (более чем на 70%) увеличением содержания сахарозы (табл. 4). Известно, что накопление растворимых сахаров – важная неспецифическая реакция растений на многие абиотические стрессоры, необходимая для их выживания, в том числе в условиях длительного действия низкой температуры [31]. С одной стороны, сахара выполняют функции осмолитиков и криопротекторов, защищая растения от обезвоживания, а с другой, стабилизируют мембраны и действуют как антиоксиданты [32].

Кроме того, сахара являются резервными веществами, и их накопление необходимо для энергоемкого процесса низкотемпературной адаптации [33].

Мы изучили влияние ЗНЧ на экспрессию двух важных COR генов – *Wcor726* и *Wcor15*. Известно, что ген *Wcor726* относится к семейству *Wcs120*, специфичному для пшеницы [34, 35]. Гены семейства *Wcs120* регулируются низкой температурой и кодируют синтез белков WCS (wheat cold stress), накопление которых коррелирует со способностью растений повышать холодоустойчивость [34]. Белки, кодируемые *Wcor726*, относятся к дегидринам, объединенным во II группу или семейство D 11 большого класса LEA (Late Embryogenesis Abundant) белков, участвующих в защите растений от обезвоживания при действии различных стрессовых факторов [36]. Белки, кодируемые *Wcor15*, относятся к III группе белков LEA, транспортируются в хлоропласты [37, 38] и содержат CRT/DRE cis-регуляторные элементы, сходные с *Wcs120* [39]. Имеются данные, что белок WCOR15 – продукт гена *Wcor15* – локализуется в хлоропластах и снижает риски фотоингибирования ФС II [40]. Как установлено в наших опытах, у незакаленных проростков пшеницы, выращенных из семян, обработанных ЗНЧ, уровень экспрессии *Wcor15* увеличивался в 8 раз (рис. 6).

Проведенные эксперименты показали, что эффекты ЗНЧ на растения пшеницы зависели от температурных условий опыта. В оптимальных температурных условиях нанопрайминг семян приводил к стимуляции ростовых процессов у проростков, повышению активности ФСА (за счет усиления экспрессии генов РБФК/О *rbcS* и *rbcL* и увеличения содержания хлорофиллов) и уровня экспрессии COR гена *Wcor15*. В условиях низкотемпературного закаливания ЗНЧ способствовали дополнительному накоплению в листьях растворимых сахаров и, как следствие, существенному повышению холодоустойчивости растений пшеницы. Следовательно, ЗНЧ способны “перепрограммировать” растительный организм, изменяя метаболизм растений и экспрессию генов стрессового ответа, что приводит к существенному увеличению стрессоустойчивости растений. Для детального понимания механизмов действия ЗНЧ на растения необходимы дальнейшие исследования, однако уже сейчас можно утверждать, что ЗНЧ могут быть использованы в биологии и сельском хозяйстве как адаптогены, усиливающие стрессоустойчивость.

Авторы выражают благодарность Дыкману Льву Абрамовичу – д.б.н., ведущему научному сотруднику Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленно-

го структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук” – за помощь в синтезе и анализе золотых наноструктур, использованных в данном исследовании.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00054 (<https://rscf.ru/project/23-26-00054/>).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Azameti M.K., Imoro A.-W.M.* Nanotechnology: a promising field in enhancing abiotic stress tolerance in plants // *Crop Design*. 2023. V. 2. Art. 100037. <https://doi.org/10.1016/j.crope.2023.100037>
2. *Zhao L., Bai T., Wei H., Gardea-Torresdey J.L., Keller A., White J.C.* Nanobiotechnology – based strategies for enhanced crop stress resilience // *Nature Food*. 2022. V. 3. P. 829. <https://doi.org/10.1038/s43016-022-00596-7>
3. *Alaqad K., Saleh T.A.* Gold and silver nanoparticles: synthesis methods, characterization routes and applications towards drugs // *J. Environ. Anal. Toxicol.* 2016. V. 6. P. 384. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000384>
4. *Dykman L.A., Khlebtsov N.G.* Methods for chemical synthesis of colloidal gold // *Russ. Chem. Rev.* 2019. V. 88. P. 229.
5. *Ramalingam V.* Multifunctionality of gold nanoparticles: plausible and convincing properties // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2019. V. 271. Art.101989. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.101989>
6. *Arora S., Sharma P., Kumar S., Nayan R., Khanna P.K., Zaidi M.G.H.* Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea* // *Plant Growth Reg.* 2012. V. 66. P. 303. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9649-z>
7. *Kumar V., Guleria P., Kumar V., Yadav S.K.* Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana* // *Sci. Total Environ.* 2013. V. 461. P. 462. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.018>
8. *Gunjan B., Zaidi M.G.H., Sandeep A.* Impact of gold nanoparticles on physiological and biochemical characteristics of *Brassica juncea* // *J. Plant Biochem. Physiol.* 2014. V. 2. P. 3. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000133>
9. *Wan Y., Li J., Ren H., Huang J., Yuan H.* Physiological investigation of gold nanorods toward watermelon // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. V. 14. P. 6089. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8853>

10. Mahakham W., Theerakulpisut P., Maensiri S., Phumying S., Sarmah A.K. Environmentally benign synthesis of phytochemicals-capped gold nanoparticles as nanopriming agent for promoting maize seed germination // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 573. P. 1089. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.120>
11. Das S., Debnath N., Pradhan S., Goswami A. Enhancement of photon absorption in the light-harvesting complex of isolated chloroplast in the presence of plasmonic gold nanosol – a nanobionic approach towards photosynthesis and plant primary growth augmentation // *Gold Bull.* 2017. V. 50. P. 247. <https://doi.org/10.1007/s13404-017-0214-z>
12. Avellan A., Yun J., Zhang Y., Spielman-Sun E., Urrine J.M., Thieme J., Li J., Lombi E., Bland G., Lowry G.V. Nanoparticle size and coating chemistry control foliar uptake pathways, translocation and leaf-to-rhizosphere transport in wheat // *ACS Nano.* 2019. V. 13. P. 5291. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09781>
13. Alhammad B.A., Abdel-Aziz H.M.M., Seleiman M.F., Tourky S.M.N. How can biological and chemical silver nanoparticles positively impact physio-chemical and chloroplast ultrastructural characteristics of *Vicia faba* seedlings? // *Plants.* 2023. V. 12. P. 2509. <https://doi.org/10.3390/plants12132509>
14. Ferrari E., Barbero F., Busquets-Fité M., Franz-Wachtel M., Köhler H-R., Puntès V., Kemmerling B. Growth-promoting gold nanoparticles decrease stress responses in *Arabidopsis* seedlings // *Nanomaterials.* 2021. V. 11. P. 3161. <https://doi.org/10.3390/nano11123161>
15. Milewska-Hendel A., Witek W., Rypien A., Zubko M., Baranski R., Storoz D., Kurczynska E.U. The development of a hairless phenotype in barley roots treated with gold nanoparticles is accompanied by changes in the symplasmic communication // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 4724. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41164-7>
16. Dai Sh., Wang B., Song Y., Xie Zh., Li Ch., Li Sh., Huang Y., Jiang M. Astaxanthin and its gold nanoparticles mitigate cadmium toxicity in rice by inhibiting cadmium translocation and uptake // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 786. P. 147496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147496>
17. Jiang M., Dai Sh., Wang B., Xie Zh., Li J., Wang L., Li Sh., Tan Yu., Tian B., Shu Q., Huang O. Gold nanoparticles synthesized using melatonin suppress cadmium uptake and alleviate its toxicity in rice // *Environ. Sci. Nano.* 2021. V. 8. P. 1042. <https://doi.org/10.1039/D0EN01172J>
18. Wahid I., Rani P., Kumari S., Ahmad R., Hussain S.J., Alamri S., Tripathy N., Khan M.I.R. Biosynthesized gold nanoparticles maintained nitrogen metabolism, nitric oxide synthesis, ions balance, and stabilizes the defense systems to improve salt stress tolerance in wheat // *Chemosphere.* 2022. V. 287:132142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132142>
19. Dykman L.A., Khlebitsov N.G. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives // *Chem. Soc. Rev.* 2012. V. 41. P. 2256. <https://doi.org/10.1039/c1cs15166e>
20. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophyll *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // *J. Plant Physiol.* 1994. V. 144. P. 307. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
21. Nakamura M. Determination of fructose in the presence of a large excess of glucose. Part IV. A modified resorcinol-thiourea-hydrochloric acid reaction // *Agric. Biol. Chem.* 1967. V. 32. P. 696. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.32.696>
22. Pashkovskiy P., Kreslavski V.D., Ivanov Y., Ivanova A., Kartashov A., Shmarev A., Strokina V., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. Influence of light of different spectral compositions on the growth, photosynthesis, and expression of light-dependent genes of scots pine seedlings // *Cells.* 2021. V. 10. P. 3284. <https://doi.org/10.3390/cells10123284>
23. Hassan H., Alatawi A., Abdulmajeed A., Emam M., Khattab H. Roles of Si and SiNPs in improving thermotolerance of wheat photosynthetic machinery via upregulation of *PsbH*, *PsbB* and *PsbD* genes encoding PSII core proteins // *Horticulturae.* 2021. V. 7. P. 16. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7020016>
24. Perdomo J.A., Buchner P., Carmo-Silva E. The relative abundance of wheat Rubisco activase isoforms is post-transcriptionally regulated // *Photosynth. Res.* 2021. V. 148. P. 47. <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00830-6>
25. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. Art. e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
26. Rhaman M.S., Tania S.S., Imran S., Rauf F., Kibria M.G., Ye W., Hasanuzzaman M., Murata Y. Seed priming with nanoparticles: an emerging technique for improving plant growth, development, and abiotic stress // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2022. V. 22. P. 4047. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-01007-3>
27. Joshi A., Nayyar A., Dharamvir K., Verma G. Detection of gold nanoparticles signal inside wheat (*Triticum aestivum* L.) and oats (*Avena sativa*) seedlings // *AIP Conf. Proc.* 2018. V. 1953. Art. 030058. <https://doi.org/10.1063/1.5032393>
28. Lahiani M.H., Dervishi E., Chen J., Nima Z., Gau-me A., Biris A.S., Khodakovskaya M.V. Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2013. V. 5. P. 7965. <https://doi.org/10.1021/am402052x>
29. Wang X., Yang X., Chen S., Li Q., Wang W., Hou Ch., Gao X., Wangand L., Wang Sh. Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Sci.* 2016. V. 6. P. 1243. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01243>

30. *Hasanpour H., Maali-Amiri R., Zeinali H.* Effect of TiO₂ nanoparticles on metabolic limitations to photosynthesis under cold in chickpea // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 779.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060096>
31. *John R., Anjum R.A., Sopory S.K., Akram N.A., Ashraf M.* Some key physiological and molecular processes of cold acclimation // *Biol. Plant.* 2016. V. 60. P. 603.
<https://doi.org/10.1007/s10535-016-0648-9>
32. *Keunen E., Peshev D., Vangronsveld J., Ende V.D., Cuypers A.* Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 1242.
<https://doi.org/10.1111/pce.12061>
33. *Chang C.Y.Y., Brautigam K., Huner N.P.A., Ensminger I.* Champions of winter survival: cold acclimation and molecular regulation of cold hardiness in evergreen conifers // *New Phytol.* 2020. V. 229. P. 675.
<https://doi.org/10.1111/nph.16904>
34. *Ouellet F., Vazquez-Tello A., Sarhan F.* The wheat *wcs120* promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species // *FEBS Lett.* 1998. V. 423. P. 324.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00116-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00116-1)
35. *Rehman S.U., Khushi M., Sher H., Que Y., Ali R., Ali S., Hassan I., Murad A., Rahat M.* Molecular analysis of cold responsive (*COR*) genes in selected sugarcane and *Saccharum spontaneum* L. // *Adv. Life Sci.* 2022. V. 9. P. 547.
36. *Winifield M.O., Lu C., Wilson I.D., Coghill J.A., Edwards K.J.* Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 749.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00536.x>
37. *NDong C., Danyluk J., Wilson K.E., Poccock T., Huner N.P., Sarhan F.* Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 1368.
<https://doi.org/10.1104/pp.001925>
38. *Liu F., Si H., Wang C., Sun G., Zhou E., Chen C., Ma C.* Molecular evolution of *Wcor15* gene enhanced our understanding of the origin of A, B and D genomes in *Triticum aestivum* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 31706.
<https://doi.org/10.1038/srep31706>
39. *Takumi S., Koike A., Nakata M., Kume S., Ohno R., Nakamura C.* Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) *Cor* gene *Wcor15* encoding a chloroplast-targeted protein // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2265.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erg247>
40. *Sun C.W., Huang Y.C., Chang H.Y.* CIA2 coordinately up-regulates protein import and synthesis in leaf chloroplasts // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 879.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.137240>

УДК 581.1:577.352:577.115

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ РАФТОВЫХ СТРУКТУР ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ

© 2024 г. Н. В. Озолина^а, *, И. С. Капустина^а, В. В. Гурина^а,
Е. В. Спиридонова^а, В. Н. Нурминский^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия
*e-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 14.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 14.12.2023 г.

Проводилось изучение влияния окислительного стресса на липидный состав рафтовых структур вакуолярных мембран, выделенных из корнеплодов столовой свеклы *Beta vulgaris* L. с целью выяснения роли этих мембранных структур в адаптационных механизмах растительной клетки. Анализировали возникающие в результате стресса изменения в качественном и количественном составе основных липидов, стеринов, жирных кислот и сравнивали с изменениями в липидах, роль которых в защите клеток от стресса достоверно установлена. Ранее в вакуолярной мембране было показано присутствие трех видов рафтовых структур. При окислительном стрессе в составе липидов этих структур происходили изменения. Наиболее существенные из них, способные повлиять на защитные механизмы растительной клетки, были выявлены в рафтовых микродоменах 4-й зоны сахарозного градиента (35% сахароза). Они состояли в увеличении содержания сфинголипидов, фосфатидилсерина, β -ситостерина, дигалактозилдиглицерида и снижении фосфатидной кислоты. Менее выраженные отличия были обнаружены в липидном составе у микродоменов 2-й зоны сахарозного градиента (15% сахароза): увеличивалось количество холестерина и сфинголипидов и снижалось содержание фосфатидной кислоты и моногалактозилдиглицерида. Среди изменений липидного состава, способных повлиять на защитные механизмы растительной клетки, у микродоменов 6-й зоны (60% сахароза) было отмечено увеличение содержания фосфатидилхолина, кампестерина и β -ситостерина. Комплекс выявленных изменений липидного состава у изучаемых рафтовых микродоменов вакуолярной мембраны может являться результатом стрессового ответа и участвовать в формировании адаптационных механизмов растительной клетки.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, адаптационные механизмы, мембранные липиды, рафты, окислительный стресс, тонопласт

DOI: 10.31857/S0015330324030091, EDN: NMFSCX

ВВЕДЕНИЕ

Влияние неблагоприятных факторов внешней среды на растения приводит к нарушению метаболизма и существенному снижению продуктивности растений. Изучение изменений, которые происходят в ответ на стрессовые воздействия, и способы их преодоления являются одной из основных задач биологии. Действие экстремальных факторов, вызывающих у клеток состояние стресса, приводит к перестройке метаболизма клетки, которая должна способ-

ствовать успешному преодолению негативной ситуации и восстановлению нарушенного гомеостаза. Одним из наиболее опасных стрессов для растений является окислительный стресс. К нему приводит любое другое стрессовое воздействие [1]. Первыми с неблагоприятными внешними воздействиями сталкиваются биологические мембраны. Известно, что мембранные липиды могут принимать участие в защите растительной клетки от стрессовых воздействий [2]. Вакуолярная мембрана является одной из наименее изученных, хотя имеет большое значение в жизнедеятельности растительной клетки. Тонoplast, как внутренняя мембрана протопласта, ограничивает вакуоль растительной клетки и обладает избирательной проницаемостью, активно участвует в процессах транспорта метаболитов, во многом определяет способность клетки к ос-

Сокращения: ЖК – жирные кислоты; НЖК – насыщенные жирные кислоты; ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты; СФ – сфинголипиды; ДГДГ – дигалактозилдиацилглицериды; МГДГ – моногалактозилдиацилглицериды; ФК – фосфатидная кислота; ФХ – фосфатидилхолины; ФЭ – фосфатидилэтанолламины; ФГ – фосфатидилглицерины; ФИ – фосфатидилинозитолы; ФС – фосфатидилсерины.

морегуляции, к регуляции рН и ионного гомеостаза цитозоля, трансдукции сигналов различной природы, а также принимает активное участие в защите клетки от абиотического стресса.

В настоящее время общепринятым является мнение о том, что биологические мембраны неоднородны и имеют доменную организацию [3]. В плазматической мембране выявлено присутствие целого ряда микро- и нанодоменов [4]. Микродомены первыми выделенные из плазмалеммы были названы рафтами [5]. По определению рафты являются микродоменами клеточных мембран, в которых вокруг определенных белков образуются области, обогащенные гликофинголипидами, стеринами и липидами с насыщенными жирными кислотами, что делает их более плотными, чем окружающая мембрана [6]. Известно, что эти мембранные структуры принимают активное участие во многих важных для растительной клетки процессах, таких как экзо- и эндоцитоз, деление, поляризация, внутриклеточная передача сигналов, образование мембранных контактов, связь с цитоскелетом и др. [7]. В тонопласте также были обнаружены рафты [8]. Используя более “мягкий” бездетергентный метод выделения рафтов из вакуолярной мембраны после высокоскоростного разделения в градиенте плотности сахарозы были выделены 3 зоны, в которых присутствовали мембранные фракции, содержащие в большом количестве липиды, характерные для липид-белковых микродоменов относимых к рафтам [9]. В липидном составе рафтов могут происходить определенные изменения, которые будут отражаться на таких биофизических параметрах мембраны как текучесть (микровязкость) и пластичность, что может быть связано с участием этих структур в адаптационных механизмах растительной клетки. Кроме того, изменения в содержании ряда мембранных фосфолипидов и гликоглицеролипидов могут стабилизировать ламеллярную структуру мембраны, предотвращая ее переход в гексагональную фазу [10], что также будет способствовать усилению защитных механизмов при воздействии стресса. Ранее нами была показана важная роль липидов вакуолярной мембраны в защите клетки от абиотических стрессов [11]. В данном исследовании было выявлено, что в выполнении этой защитной функции могут принимать участие липиды микродоменов (рафтов), присутствующие в тонопласте. Анализируя и сравнивая наши результаты с данными других исследователей, изучающих роль мембранных липидов в защите растительной клетки от стрессов, мы полагаем, что липиды, входящие в состав рафтов вакуолярной мембраны, играют важную роль в защите растительной клетки от абиотических стрессов.

Цель данного исследования состояла в изучении изменений происходящих в составе липи-

дов рафтовых микродоменов тонопласта после окислительного стресса, и выяснении роли рафтовых структур в защитных механизмах растительной клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.), которые самостоятельно выращивали в полевых условиях. Корнеплоды, находились в периоде покоя и хранились в течение нескольких месяцев при температуре 4–6°C.

Вакуолярные мембраны получали описанным ранее методом [12] из контрольных корнеплодов и корнеплодов, подвергнутых окислительному стрессу. Чистоту выделенной мембранной фракции оценивали при помощи специфических ингибиторов H^+ -АТФаз. Азид натрия (NaN_3), ванадат натрия (Na_3VO_4) и бафиломицин являются ингибиторами F-, P- и V-типа H^+ -АТФаз соответственно. В экспериментах по определению чистоты полученных фракций тонопласта, азид натрия и ванадат натрия практически не влияли на активность H^+ -АТФаз изолированных везикул, в то время как бафиломицин подавлял активность на 95%. АТФазную активность измеряли путем количественного определения неорганического фосфата, высвобождаемого из АТФ по методу [13] в модификации Скулачева и выражали как отношение концентрации неорганического фосфата к концентрации белков за 1 ч. Количество белка определяли по методу Брэдфорд [14], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. Проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что мембранная фракция является достаточно чистой и может быть использована в экспериментах.

Выделение липидно-белковых микродоменов (рафтов). Схема выделения липид-белковых микродоменов из мембранных везикул тонопласта контрольных корнеплодов и корнеплодов, подвергнутых стрессу, приведена в статье [15]. Мембранные везикулы замораживали и оттаивали, затем встряхивали в течение 30 мин при скорости 1200–1400 об/мин на шейкере (“IKA Werke”, Германия) при 4°C в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$, 300 мМ сахарозы, 0.2 мМ аминок-этилбензол сульфонил фторида, 1 мг/мл аprotинина, 10 мкМ бестатина, 3 мкМ E-64, 10 мг/мл лейпептина, 2 мкМ пепстатин, рН 7.8, и помещали под раствор с градиентом плотности сахарозы 15–60%. Центрифугировали в течение 18 ч при 200000 g. После центрифугирования мембранные фракции в градиенте сахарозы были разделены на зоны, представленные на схеме в ранее опубликованной статье [15]. В ранее проведенных экспериментах было показано, что рафтовые структуры

находятся в зоне 2 (15% сахарозы, плотность 1.050 г/см³), зоне 4 (35% сахарозы, плотность 1.110 г/см³) и зоне 6 (60% сахарозы, плотность 1.154 г/см³). Затем анализировали в этих зонах количественный и качественный состав липидов, стеринов и жирных кислот.

Условия создания окислительного стресса.

Для создания окислительного стресса кусочки ткани корнеплода инкубировали в растворе 100 мМ Н₂O₂ в течение 16 ч. В контрольном варианте инкубацию таких же кусочков ткани корнеплодов проводили в дистиллированной воде. Таким образом, мы исключали влияние гипоосмотического стресса. При подборе эффективных условий стрессового воздействия использовали более низкие концентрации перекиси водорода (20, 40 и 50 мМ), но они не давали достаточно эффективного стрессового воздействия, которое оказывала концентрация 100 мМ. Для характеристики эффективности стрессового воздействия на корнеплоды использовали кондуктометрический метод [16]. Также определяли содержание диеновых конъюгатов, которое проводили по методу [17]. Влияние стрессов на барьерные свойства мембран (стабильность мембран) изучали с использованием цейтраферной видеосъемки [18].

Анализ мембранных липидов. Суммарные липиды из рафтовых микродоменов тонопласта расположенных в 2, 4 и 6 зонах градиента плотности сахарозы экстрагировали по методу [19]. Количество общих липидов в экстрактах определяли гравиметрическим методом в вакууме до постоянной массы аликвот экстракта. Полярные липиды разделяли методом ТСХ с использованием двумерной системы: первое направление – хлороформ–метанол–бензол–28% NH₄OH (65 : 30 : 10 : 6 по объему), второе направление – хлороформ–метанол–уксусная кислота–ацетон–бензол–вода (70 : 30 : 4 : 5 : 10 : 1 по объему). Нейтральные липиды разделяли в системе гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (80 : 20 : 1 по объему). Идентификацию пятен осуществляли распылением специальных реагентов, определением R_f пятен и использованием соответствующих стандартов. Денситометрический анализ проводился с использованием ImageJ и Microsoft Excel. Сканирование выполнялось с помощью МФУ Brother dcp-12500dr. Определение содержания отдельных липидов в зонах градиента плотности сахарозы представлено в процентах от общего количества.

Анализ стеринов. Для анализа стеринов использовали одномерную ТСХ в системе растворителей нейтральных липидов гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (80 : 20 : 1 по объему). Стерины, элюированные с пластинок хлороформом и этилацетатом, силилировали гексаметилдисилазаном и N,O-бис(триметилсил)

ацетамидом. Полученные триметилсилильные производные стеринов анализировали с помощью хромато-масс-спектрометра GC-MS 7000/7890A Triple Quad (“Agilent Technologies”, США). Стерины идентифицировали путем сравнения времени их удерживания со стандартами. Также использовались библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7. Количественный анализ проводили с использованием калибровочной кривой для холестерина, кампестерина, стигмастерина и β-ситостерина. В качестве внутреннего стандарта использовали эргостерин. Распределение содержания каждого стерина в зонах градиента плотности сахарозы, содержащих рафтовые микродомены, представлено в процентах от общего количества.

Анализ жирных кислот. Экстрагированные липиды были использованы в экспериментах по изучению состава жирных кислот (ЖК) в рафтовых микродоменах тонопласта, выделенных из 2, 4 и 6 зон сахарозного градиента. Метилловые эфиры жирных кислот получали по методу [20]. Анализ метиловых эфиров ЖК тонопласта проводили с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS (“Agilent Technologies”, США). Детектором служил квадрупольный масс-спектрометр (“Agilent Technologies”, США); в качестве метода ионизации использовался электронный удар; энергия ионизации составляла 70 эВ. Для анализа использовался режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0.50 мкм) (“Hewlett-Packard”, США). Неподвижной фазой служил полиэтиленгликоль. Подвижной фазой служил гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Температура составляла: 250°C для испарителя, 230°C для источника ионов, 150°C для детектора и 280°C для линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром. Диапазон сканирования составлял 4–450 а.е.м. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл при соотношении потоков 5 : 1. Хроматографию проводили в изотермическом режиме при 200°C. Для идентификации пиков метиловых эфиров ЖК использовали стандарты метиловых эфиров (“Sigma”, США) и метод масс-спектрометрии с использованием библиотеки масс-спектров NIST 05. Результаты представлены в процентах от общего количества ЖК.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программный пакет SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили не менее чем в трех независимых повторностях. Результаты приведены в %. В таблицах данные представлены как медианы в виде межквартильной широты (25; 75 перцентиль). Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (* – P < 0.01).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе проводилась оценка влияния окислительного стресса. Результаты проведенных экспериментов показали, что в условиях окислительного стресса выход электролитов из кусочков тканей корнеплода увеличивался более чем в 1.5 раза. Это свидетельствовало о нарушении избирательной проницаемости мембран растительной клетки при окислительном стрессе. Подобные результаты были полу-

чены при оценке стабильности изолированных вакуолей. Было показано, что при окислительном стрессе период полураспада вакуолей уменьшался более чем в 2 раза, то есть темпы разрушения были очень высокими. О процессах перекисного окисления липидов, которые происходили при окислительном стрессе судили по увеличению количества диеновых конъюгатов, которое возросло на 15%. Таким образом, был сделан вывод, что стрессовая нагрузка при

Таблица 1. Количественное содержание основных классов липидов в рафтовых микродоменах из 2, 4 и 6 зон сахарозного градиента после высокоскоростного центрифугирования тонопласта, выделенного из контрольных и подвергнутых окислительному стрессу корнеплодов, % от общей массы липидов

Липиды, %	Рафты зоны 2		Рафты зоны 4		Рафты зоны 6	
	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс
ФХ	3.5 [3.5; 4.1]	3.4 [3.4; 3.6]	3.4 [3.3; 3.9]	4.4 [4.2; 4.5]	0.5 [0.4; 0.5]	2.4 [2.0; 3.8]*
ФЭ	2.6 [2.5; 3.1]	2.8 [2.3; 2.8]	4.0 [3.0; 5.5]	3.0 [2.8; 4.3]	—	1.2 [1.1; 1.8]
ФХ/ФЭ	1.4	1.2	0.9	1.5	—	2.0
ФС	0.8 [0.6; 0.8]	0.2 [0.1; 0.3]*	0.2 [0.1; 0.2]	0.4 [0.4; 0.4]*	—	—
ФИ	0.8 [0.8; 1.2]	1.4 [1.4; 1.8]*	0.9 [0.8; 1.0]	0.9 [0.7; 1.1]	—	0.5 [0.5; 1.1]
ФГ	1.0 [0.8; 1.1]	0.7 [0.6; 0.9]	1.0 [0.9; 1.0]	0.2 [0.2; 0.2]*	—	1.0 [1.0; 1.1]
ФК	4.0 [3.2; 4.0]	0.5 [0.4; 1.1]*	4.3 [3.3; 4.4]	0.3 [0.3; 0.3]*	—	1.5 [1.4; 1.9]
ДГДГ	9.9 [8.2; 10.4]	6.2 [6.0; 6.4]	1.4 [1.4; 1.8]	7.2 [6.9; 7.3]*	5.2 [5.1; 6.0]	8.3 [7.3; 10.2]
МГДГ	6.3 [6.0; 6.9]	4.6 [4.4; 4.7]*	4.9 [4.6; 5.3]	5.7 [5.4; 6.3]	1.5 [1.3; 1.7]	4.8 [4.5; 6.4]*
МГДГ/ДГДГ	0.6	0.7	3.5	0.8	0.3	0.6
СФ	13.6 [12.3; 13.8]	19.8 [19.0; 20.4]*	4.3 [3.2; 5.3]	18.0 [17.2; 18.6]*	8.8 [8.2; 9.2]	10.5 [9.4; 10.6]
Стерины	5.8 [5.8; 5.9]	4.1 [4.0; 4.5]*	6.4 [6.1; 6; 7]	7.2 [7.2; 7.6]*	4.0 [4.0; 4.4]	3.7 [3.5; 4.2]
Эфиры стеринов	9.7 [9.3; 9.9]	5.4 [5.2; 6.2]*	7.2 [6.8; 7.6]	7.0 [6.7; 7.6]	10.3 [9.7; 11.2]	9.2 [8.8; 10.0]
Углеводороды	12.2 [11.8; 12.7]	14.2 [12.7; 14.2]	23.8 [21.0; 24.1]	15.6 [15.2; 16.3]*	29.7 [27.6; 31.0]	22.9 [22.3; 25.2]

Примечание. Данные представлены в виде медиан, а диапазон значений представлен в виде межквартильной широты [25; 75 процентиль]. Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (* – $P < 0.01$). Данные были получены методом ТСХ-денситометрии. ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин; МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин; ФК – фосфатидная кислота; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ФГ – фосфатидилглицерин; ФИ – фосфатидилинозитол; ФС – фосфатидилсерин; СФ – сфинголипид.

воздействию перекиси водорода на клетки корнеплода столовой свеклы была достаточно интенсивной.

В табл. 1 приведены результаты анализа содержания основных классов липидов в рафтовых микродоменах тонопласта после окислительного стресса. Отличия наблюдались во всех микродоменах, но в каждом виде микродоменов в разной степени. В микродоменах, выделенных из 4-й зоны сахарозного градиента изменения в составе липидов связаны с заметным увеличением содержания сфинголипидов (СФ), дигалактозилдиацилглицеридов (ДГДГ) и небольшим увеличением содержания фосфатидилсеринов (ФС) и стеринов. В то же время отмечено снижение фосфатидной кислоты (ФК), фосфатидилглицеринов (ФГ) и углеводов. Среди липидов микродоменов 2-й зоны сахарозного градиента произошло небольшое увеличение содержания СФ и фосфатидилинозитолов (ФИ) и снижение содержания ФК, ФС, моногалактозилдиацилглицеридов (МГДГ), стеринов и эфиров стеринов. Изменения после окислительного стресса среди липидов микродоменов из 6-й зоны сахарозного градиента были связаны с заметным увеличением содержания фосфатидилхолинов (ФХ) и МГДГ. Также было обнаружено появление небольшого количества таких фосфолипидов как фосфатидилэтаноламина (ФЭ), ФК, ФИ и ФГ, которые до стресса не выявлялись.

Рассматривая изменения в содержании стеринов микродоменов тонопласта после окислительного стресса, можно отметить, что, как и в предыдущей серии экспериментов были выявлены заметные различия между микродоменами (табл. 2). Так, содержание холестерина увеличивалось в рафтах из 2 зоны сахарозного

градиента, снижалось в рафтах из 4 зоны и не изменялось в рафтах из 6 зоны сахарозного градиента. Увеличение β -ситостерина после окислительного стресса происходило в рафтах из 4 и 6-й зон сахарозного градиента. Изменения в составе кампестерина и стигмастерина происходили только в рафтах из 6-й зоны, причем содержание кампестерина увеличивалось, а стигмастерина снижалось.

При анализе изменений в составе ЖК рафтовых микродоменов тонопласта после окислительного стресса отмечено, что почти во всех микродоменах преобладала пальмитиновая ЖК (С16:0) (табл. 3). Наименее заметные изменения отмечены в микродоменах 2-й зоны сахарозного градиента. Произошло перераспределение в составе насыщенных жирных кислот (НЖК): уменьшилось содержание пальмитиновой ЖК и, соответственно, увеличилось содержание миристиновой (С14:0), маргариновой (С17:0) и стеариновой (С18:0) ЖК. Сумма НЖК после окислительного стресса достоверно не изменилась. В составе ЖК микродоменов из 4 зоны сахарозного градиента были также отмечены различия связанные, главным образом, с изменениями в содержании НЖК, кроме того произошло увеличение ненасыщенной линоленовой ЖК (С18:3(n-3)). В результате этого уменьшилась сумма НЖК и, соответственно, увеличилось соотношение Σ ННЖК/ Σ НЖК. Другие изменения произошли в составе ЖК у рафтовых микродоменов 6 зоны сахарозного градиента. Здесь в отличие от предыдущих микродоменов наблюдается хорошо заметное увеличение содержания ненасыщенной линолевой ЖК (С18:2(n-6)), еще более заметное снижение суммы НЖК и увеличение соотношения Σ ННЖК/ Σ НЖК.

Таблица 2. Количественное содержание основных классов стеринов в рафтовых микродоменах из 2, 4 и 6 зон сахарозного градиента после высокоскоростного центрифугирования тонопласта в контроле и после окислительного стресса, % от суммы всех стеринов

Стерины, %	Рафты зоны 2		Рафты зоны 4		Рафты зоны 6	
	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс
холестерин	4.3 [4.2; 4.6]	11.0 [10.2; 11.1]*	9.1 [8.2; 9.3]	3.6 [3.6; 4.0]*	5.9 [5.5; 6.0]	5.8 [5.4; 5.9]
кампестерин	10.0 [9.4; 10.2]	9.8 [8.4; 9.9]	7.5 [6.6; 7.8]	7.2 [6.3; 7.6]	9.9 [9.3; 10.0]	11.2 [10.9; 11.5]*
стигмастерин	36.1 [33.2; 37.4]	31.5 [31.2; 36.6]	46.1 [43.4; 46.7]	39.7 [34.7; 40.4]	37.3 [35.3; 39.0]	26.0 [23.6; 28.3]*
β -ситостерин	49.1 [48.0; 52.8]	47.7 [44.8; 47.9]	38.5 [38.2; 40.4]	49.9 [49.3; 54.21]*	47.7 [45.5; 49.7]	57.5 [55.0; 59.6]*

Примечание. Данные представлены как медианы в виде межквартильной широты [25-й; 75-й процентиль]. Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (* – $P < 0.01$). Данные были получены методом ГХ-МС.

Таблица 3. Содержание жирных кислот в рафтовых микродоменах из 2, 4 и 6 зон сахарозного градиента после высокоскоростного центрифугирования тонопласта из контрольных и подвергнутых окислительному стрессу корнеплодов столовой свеклы, % от суммы всех ЖК

ЖК, %	Рафты зоны 2		Рафты зоны 4		Рафты зоны 6	
	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс
C14:0	–	7.2 [7.0; 7.6]	–	–	–	–
C15:0	1.7 [1.6; 1.8]	1.7 [1.5; 2.8]	1.4 [1.4; 1.4]	1.2 [1.1; 1.2]*	9.3 [8.2; 9.5]	1.4 [1.1; 1.6]*
C16:0	53.2 [51.8; 56.9]	37.8 [37.3; 39.3]*	36.3 [36.1; 37.1]	27.7 [26.5; 28.5]*	46.4 [45.4; 47.7]	37.1 [36.3; 40.8]
C17:0	–	0.4 [0.4; 0.4]	–	1.7 [1.6; 1.8]	–	–
C18:0	8.4 [7.5; 9.5]	12.1 [12.0; 12.7]*	7.4 [5.9; 8.0]	2.6 [2.5; 2.9]*	24.5 [22.4; 24.4]	12.3 [11.9; 12.8]*
C18:1(n-9)	22.2 [18.6; 22,2]	23.0 [22.9; 23.9]	23.1 [21.3; 23.3]	22.0 [21.8; 24.6]	10,0 [8.1; 10.3]	19.7 [14.8; 20.4]
C18:1(n-7)	3.9 [3.8; 4.0]	5.6 [3.1; 6.2]	5.6 [4.2; 5.6]	8.4 [6.7; 8.5]	4.6 [3.8; 7.0]	9.7 [9.4; 10.0]
C18:2(n-6)	10.6 [9.4; 12.8]	11.1 [10.5; 11.4]	26.3 [24.9; 29.0]	35.0 [32.9; 35.7]	4.9 [4.4; 7.8]	20.7 [20.3; 21.0]*
C18:3(n-3)	–	–	1.1 [1.1; 1.4]	2.3 [1.9; 2.5]*	–	–
ΣНЖК	65.5 [62.3; 68.0]	59.7 [59.2; 62.6]	46.0 [44,1; 46.3]	32.84 [31.5; 34.2]*	80.6 [77.2; 81.5]	51.4 49.9; 55.0]*
ΣННЖК	34.5 [32.0; 37.7]	40.3 [37.4; 40.8]	54.0 [53.8; 55.9]	67.2 [65.8; 68.5]*	19.4 [18.5; 22.8]	48.6 [45.0; 50.1]*
ΣННЖК/ ΣНЖК	0.5 [0.5; 0.6]	0.7 [0.6; 0.7]	1.2 [1.2; 1.3]	2.2 [1.9; 2.2]*	0.2 [[0.2; 0.3]	0.9 [0.8; 1.0]*

Примечание. Данные представлены как медианы в виде межквартильной широты [25; 75 процентиль]. Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (* – $P < 0.01$). Данные получены методом ГХ-МС. НЖК – насыщенные жирные кислоты; ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучению роли мембранных липидов в защите клеток от стресса посвящено много исследований. Выявлены классы мембранных липидов, которые могут принимать активное участие в защите растительной клетки от стресса. Отчетливо показана стабилизирующая, упорядочивающая роль мембранных стероидов и сфинголипидов при стрессовых воздействиях. Они регулируют микровязкость (текучесть) и пластичность мембран, участвуют в адаптационных механизмах растительных клеток [21]. В наших экспериментах после окислительного стресса хорошо заметно увеличение этих липидов в микродоменах 2 и особенно 4-й зоны

сахарозного градиента. Рассматривая подробно изменения в составе стероидов вакуолярной мембраны после окислительного стресса, можно отметить более чем двукратное увеличение в микродоменах 2-й зоны содержания холестерина. Этот стерин, который встречается в растительных мембранах в небольшом количестве, играет важную роль в регуляции биофизических характеристик мембран. Ранее было показано, что холестерин экранирует отрицательные заряды и, тем самым, снижает поверхностный заряд мембраны [22]. Это способствует более плотной упаковке углеводородных цепей в фазе геля, а, следовательно, дополнительному повышению микровязкости мембраны и возможно-

му уменьшению ее проницаемости. Также из изменений, которые могут иметь адаптивный характер можно отметить увеличение содержания “антистрессового” стерина – кампестерина в микродоменах 6-й зоны, который, по мнению ряда исследователей, связан с защитными механизмами растительной клетки [23]. В микродоменах 4 и 6 зон отмечено увеличение содержания ситостерина. Известно, что среди различных стероидов β -ситостерин является основным стероидом, укрепляющим растительные мембраны [24]. Кроме того, известно, что β -ситостерин обладает высокой антиоксидантной активностью [25] и способен регулировать текучесть и проницаемость мембран путем взаимодействия с насыщенными алкильными цепями фосфолипидов и сфинголипидов, ограничивая их подвижность, так же, как и холестерин в клетках млекопитающих [26]. Мутанты с повышенным содержанием β -ситостерина обладали большей устойчивостью к окислительному стрессу по сравнению с диким типом [27].

После воздействия окислительного стресса отмечены также изменения среди полярных липидов в исследуемых рафтовых микродоменах. Фосфолипиды и гликолипиды играют существенную роль в стабилизации липидного бислоя, что особенно важно при защите от стрессового воздействия. Известно, что увеличение содержания таких липидов как ФХ, ФИ, ФГ и ДГДГ обеспечивает стабилизацию бислоевой структуры, тогда как увеличение содержания ФЭ и МГДГ способствует переходу мембран в гексагональную фазу [28]. Изменения в составе фосфолипидов у разных микродоменов существенно различались. Из липидов, которые стабилизируют бислоевую структуру в рафтовых микродоменах отмечено увеличение ДГДГ у рафтов из 4-й зоны сахарозного градиента и увеличение ФИ в рафтовых микродоменах из 2-й зоны. В рафтовых структурах из 6 зоны также увеличилось содержание ФХ, ФИ и ФГ, что может быть связано со стабилизацией липидной мембраны. Наиболее заметные изменения среди фосфолипидов этих микродоменов произошли в содержании ФК, которые существенно уменьшились в микродоменах 2 и 4 зон и увеличивались в рафтовых микродоменах 6 зоны. Это изменение в содержании ФК могут быть связаны с адаптивной защитной реакцией, поскольку из литературных данных известно, что снижение содержания ФК способствовало поддержанию бислоевой структуры мембраны, усиливало ее текучесть, процессы дегидратации и препятствовало индукции гидрофильных водных каналов [29]. Высокое содержание ФК среди фосфолипидов является отличительной особенностью вакуолярной мембраны. В тонопласте, выделенном из корнеплодов столовой

свеклы, содержание ФК составляло 14.6% от всех фосфолипидов [30]. Тогда как в других мембранах содержание ФК было значительно меньше – так в плазмалемме из ананаса содержание ФК составляло 3–4% от суммы фосфолипидов [31]. При изучении влияния стрессов на липидные профили другие исследователи наиболее часто отмечали повышение содержания ФК [32, 33]. После низкотемпературной обработки в 10 раз увеличивалось содержание ФК в листьях *Arabidopsis*, но в этих экспериментах содержание ФК в контрольных растениях составляло 0.7% от суммы всех фосфолипидов [34], а не 14.6%, как в вакуолярной мембране из корнеплодов столовой свеклы. У микродоменов 6 зоны сахарозного градиента адаптивные изменения в большей степени связаны с увеличением содержания ФХ, который хорошо стабилизирует ламеллярную структуру мембран [10].

После окислительного стресса произошли изменения и среди гликоглицеролипидов: заметно увеличилось содержание МГДГ у микродоменов 6 зоны и снизилось в микродоменах 2 зоны, в то время как для ДГДГ отмечено увеличение содержания, но только в микродоменах 4 зоны. Эти изменения привели к существенному снижению соотношения МГДГ/ДГДГ у микродоменов 4 зоны и увеличению в других микродоменах, особенно заметно для микродоменов 6 зоны. Известно, что у более устойчивых растений увеличение этого соотношения связывают со стабилизацией структуры мембраны [35]. Также с процессом стабилизации мембраны и упорядочением липидного бислоя связывают повышение содержания ДГДГ, тогда как увеличение содержания МГДГ может нарушать целостность липидного бислоя, вызывая переход в гексагональную липидную фазу [36]. Таким образом, изменения содержания гликоглицеролипидов также могут участвовать в защите растительной клетки от окислительного стресса.

Изменения в составе ЖК мембранных липидов при стрессе ответственны за структурные перестройки клеточных мембран, поэтому в настоящее время они рассматриваются как один из механизмов адаптации организмов к стрессовому воздействию [37]. Анализируя результаты экспериментов по изменению содержания ЖК в рафтовых микродоменах 2, 4 и 6-й зон сахарозного градиента после высокоскоростного разделения тонопласта из контрольных корнеплодов и корнеплодов, подвергнутых окислительному стрессу, можно сделать вывод, что наиболее существенные изменения произошли в микродоменах из 4 и 6 зон. Эти изменения привели к увеличению суммы ННЖК и соотношения Σ ННЖК/ Σ НЖК. Важным показателем включения защитных механизмов клетки при небла-

гоприятных воздействиях является увеличение содержания ненасыщенных ЖК в составе мембранных липидов [38]. Это явление было отмечено при разных видах абиотического стресса. Увеличение концентрации ненасыщенных ЖК один из важнейших факторов низкотемпературной адаптации, что было неоднократно продемонстрировано на многих растительных объектах [39]. Установлено также, что повышение содержания ненасыщенных ЖК в мембранах растительных тканей увеличивает устойчивость растений к действию патогенов [40]. Увеличение ненасыщенных ЖК мембранных липидов определяет такие показатели как микровязкость, проницаемость и делает мембрану более эластичной.

Ранее нашим коллективом исследовалось влияние окислительного стресса на липидный состав исходной вакуолярной мембраны [11]. Было показано, что в тонопласте после окислительного стресса из наиболее заметных адаптивных изменений отмечалось существенное снижение ФК (37% от контроля), увеличение содержания ДГДГ (353%), увеличение содержания суммы стерина (194%). В полученных нами результатах по анализу состава липидов рафтовых структур тонопласта после окислительного стресса мы видим подобные изменения в составе липидов, что подтверждает роль рафтовых структур в защитных механизмах растительной клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассматривая участие рафтовых микродоменов из разных зон сахарозного градиента после высокоскоростного разделения тонопласта в защитных механизмах растительной клетки можно сделать вывод о том, что после окислительного стресса во всех зонах, были отмечены изменения в составе липидов, которые можно отнести к адапционным. Так, в микродоменах 2 и 4 зон сахарозного градиента отмечено увеличение содержания СФ, способных стабилизировать структуру мембран и приводить к снижению содержания ФК, что способствует поддержанию бислойной структуры мембраны. Кроме того, в 4 зоне отмечено увеличение содержания β -ситостерина и ДГДГ, что может усиливать защитные механизмы клетки. У микродоменов 2 зоны из изменений, которые можно отнести к адаптивным отмечено уменьшение содержания МГДГ, а среди стерина увеличение содержания холестерина. Другие варианты возможных защитных механизмов присутствовали у микродоменов из 6 зоны сахарозного градиента. Это увеличение содержания ФХ и соотношения МГДГ/ДМГДГ, которые способствовали стабилизации ламеллярной структуры мембран, а также увеличение

среди стерина доли “антистрессового” кампестерина.

Комплекс выявленных изменений липидного состава у рафтовых микродоменов вакуолярной мембраны может быть связан с защитными механизмами, которые запускаются в клетках растений в условиях окислительного стресса, а функциональная роль мембранных рафтовых структур связана с адапционными механизмами растительной клетки.

Работа выполнена с использованием оборудования Центрального аналитического центра “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск. Данная работа выполнена в рамках проекта, финансируемого за счет государственного бюджета (№ 122041100052-0).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Меньшикова Е.Е., Зенков Н.А.* Антиоксиданты и ингибиторы радикальных процессов // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113. № 4. С. 442.
2. *Okazaki Y., Saito K.* Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants // Plant J. 2014. V. 79. P. 584. <https://doi.org/10.1111/tpj.12556>
3. *Gronnier J., Gerbeau-Pessot P., Germain V., Mongrand S., Simon-Plas F.* Divide and rule: plant plasma membrane organization // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. P. 899. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.07.007>
4. *Cassim A.M., Gouguet P., Gronnier J., Laurent N., Germain V., Grison M., Boulté Y., Gerbeau-Pissot P., Simon-Plas F., Mongrand S.* Plant lipids: key players of plasma membrane organization and function // Prog. Lipid Res. 2019. V. 73. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.11.002>
5. *Peskan T., Westermann M., Oelmüller R.* Identification of low-density Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains in higher plants // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 6989. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01776.x>
6. *Lingwood D., Simons K.* Lipid rafts as a membrane-organizing principle // Sci. 2010. V. 327. P. 46. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>
7. *Pike L.J.* Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1746. P. 260. <https://doi.org/10.106/jbbamcr.200.05.005>
8. *Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Yu.* Tonoplast of Beta

- vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains // *Planta*. 2013. V. 237. P. 859. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1800-1>
9. *Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N.* Non-detergent isolation of membrane structures from beet plasmalemma and tonoplast having lipid composition characteristic of rafts // *J. Membr. Biol.* 2020. V. 253. P. 479. <https://doi.org/10.1007/s00232-020-00137-y>
 10. *Narayanan S., Tamura P.J., Roth M.R., Vara Prasad P.V., Welti R.* Wheat leaf lipid composition during heat stress: I. High day and night temperatures result in major lipid alterations // *Plant Cell Environ.* 2015. V. 39. P. 787. <https://doi.org/10.1111/pce.12649>
 11. *Ozolina N.V., Gurina V.V., Nesterkina I.S., Nurminsky V.N.* Variations in the content of tonoplast lipids under abiotic stress // *Planta*. 2020. V. 251. P. 107. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03399-x>
 12. *Салеев П.К., Кузеванов В.Я., Ханмагаев С.Б., Копытчук В.Н.* Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // *Физиология растений*. 1981. Т. 28. С. 1295. <https://elibrary.ru/item.asp?id=26264616>
 13. *Никулина Г.Н.* Обзор методов количественного определения фосфора по образованию молибденовой сини. Ленинград: Наука, 1965. 45 с.
 14. *Bradford 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>
 15. *Ozolina N.V., Kapustina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N.* Role of tonoplast microdomains in plant cell protection against osmotic stress // *Planta*. 2022. V. 255. P. 65. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03800-3>
 16. *Ristic Z., Ashworth E.N.* Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation // *Protoplasma*. 1993. V. 172. P. 111. <https://doi.org/10.1007/BF01379368>
 17. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., Франк Г.М.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва: Наука, 1972. 252 с.
 18. *Нурминский В.Н., Корзун А.М., Розинов С.В., Салеев П.К.* Компьютерная цейтраферная видеосъемка фракции изолированных вакуолей // *Биомедицинская химия*. 2004. Т. 50. С. 180.
 19. *Folch J., Lees M., Sloan Stanley G.H.* A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. P. 497. [http://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](http://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
 20. *Christie W.W.* Equivalent chain lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1988. V. 447. P. 305. <https://lipidlibrary.aocs.org/lipid-analysis/selected-topics-in-the-analysis-of-lipids/preparation-of-ester-derivatives-of-fatty-acids-for-chromatographic-analysis>
 21. *Zhou Y., Pan X., Qu H., Underhill S.J.* Low temperature alters plasma membrane lipid composition and ATPase activity of pineapple fruit during blackheart development // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2014. V. 46. P. 59. <https://doi.org/10.1007/s10863-013-9538-4>
 22. *Болдырев А.А.* Биологические мембраны и транспорт ионов. Москва: МГУ, 1985. 208 с.
 23. *Валитова Ю.Н., Сулкарнаева Ф.Г., Минабаева Ф.В.* Растительные стеринны: многообразие, биосинтез, физиологические функции // *Биохимия*. 2016. Т. 81. С. 1050. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
 24. *Shuler I., Milon A., Nakatani Y., Ourisson G., Albrecht A.M., Benveniste P., Hartman M.A.* Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain phosphatidylcholine bilayers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 6926. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.6926>
 25. *Wang T., Hicks K.B., Moreau R.* Antioxidant activity of photosterols, oryzanol, and other phytosterols conjugates // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002. V. 79. P. 1201. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0628-x>
 26. *Hartmann M.A.* Plant sterols and the membrane environment // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3. P. 170. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01233-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01233-3)
 27. *Wegener A., Gimbel W., Werner T., Hani J., Ernst D., Sandermann H.* Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-syntas // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1350. P. 247.
 28. *Геннис П.* Биомембраны: молекулярная структура и функции. Москва: Мир, 1997. 624 с.
 29. *Wu J.L., Seliskar D.M., Gallagher J.L.* The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress // *Am. J. Bot.* 2005. V. 92. P. 852. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.5.852>
 30. *Макаренко С.П., Коненкина Т.А., Салеев П.К.* Химический состав и структура вакуолярных мембран // *Биологические мембраны*. 1992. Т. 9. С. 290.
 31. *Zhou Y., Pan X., Qu H., Underhill S.J.* Low temperature alters plasma membrane lipid composition and ATPase activity of pineapple fruit during blackheart development // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2014. V. 46. P. 59. <https://doi.org/10.1007/s10863-013-9538-4>
 32. *Arisz S.A., van Wijk R., Roels W., Zhu J.K., Haring M.A., Munnik T.* Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase // *Front. Plant Sci.* V. 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00001>
 33. *McLeoughlin F., Arzis S.A., Dekker H.L., Kramer G., de Koster C.G., Haring M.A., Munnik T., Testerink C.* Identification of novel candidate phosphatidic acid-binding proteins involved in the salt-stress response of *Arabidopsis thaliana* roots // *Biochem. J.* 2013. V. 450. P. 573. <https://doi.org/10.1042/BJ20121639>

34. *Welti R., Li W., Li M., Sang Y., Biesiada H., Zhou H.E., Rajashekar C.B., Williams T.D., Wang X.* Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 3199.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M205375200>
35. *Шишова М.Ф., Емельянов В.В.* Изменение протеома и липидома мембран растительной клетки в ходе развития // *Физиология растений.* 2021. Т. 68. С. 800.
<https://doi.org/10.31857/S001533032105016X>
36. *Su K., Bremer D.J., Jeannotte R., Welti R., Yang C.* Membrane lipid composition and heat tolerance in cool-season turfgrasses, including a hybrid bluegrass // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2009. V. 134. P. 511.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.134.5.511>
37. *Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Генерозова И.П., Шугаев А.Г., Фаттахов С.Г.* Жирнокислотный состав липидов мембран и энергетика митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды // *Физиология растений.* 2013. Т. 60. С. 205.
<https://doi.org/10.1134/S1607672911020104>
38. *Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I.* Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // *Photosynth. Res.* 2013. V. 116. P. 489.
<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9823-4>
39. *Badea C., Basu S.K.* The effect of low temperature on metabolism of membrane lipids in plants and associated gene expression // *Plant OMICS.* 2009. V. 2. P. 78.
https://www.pomics.com/Saikat_2_2_2009_78_84.pdf
40. *Дёмин И.Н., Нарайкина Н.В., Цыдендамбаев В.Д., Мошков И.Е., Трунова Т.И.* Введение гена *desA* 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерий повышают устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией // *Физиология растений.* 2008. Т. 55. С. 710.

УДК 581.1

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ *Sorghum bicolor* НА БАКТЕРИЗАЦИЮ И ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОЛЛЮТАНТОВ

© 2024 г. О. В. Турковская^{а,*}, А. Д. Бондаренкова^а, С. Н. Голубев^а, Н. Н. Позднякова^а,
Е. В. Дубровская^а, И. Ю. Сунгурцева^а, А. Ю. Муратова^а

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”,
Саратов, Россия

*e-mail: turkovskaya_o@ibppm.ru

Поступила в редакцию 03.07.2023 г.

После доработки 02.09.2023 г.

Принята к публикации 07.09.2023 г.

Исследованы физиолого-биохимические параметры сорго веничного (*Sorghum bicolor* L. Moench), характеризующие реакции его 3-недельных проростков на присутствие биотического (бактериальный штамм *Gordonia* sp. N7) и абиотических (никель и н-гексадекан) факторов. Исследованы такие показатели как выживаемость растений, биомасса корней и побегов, индексы толерантности, транслокационный фактор никеля, содержание фотосинтетических пигментов, спектр и активность пероксидаз в корневых экссудатах. Показано, что реакции сорго на комбинированное воздействие стрессоров отличались от таковых при их индивидуальном воздействии. Показано, что н-гексадекан и бактериализация по-отдельности и совместно оказывали стимулирующее влияние на прирост биомассы сорго. Напротив, никель в использованной концентрации (20 мг/кг) проявлял выраженное ингибирующее воздействие на изученные показатели. Комбинирование исследуемых компонентов изменяло некоторые показатели относительно индивидуальных, однако токсичность металла доминировала, существенно нивелируя стимулирующее влияние н-гексадекана и актинобактерий рода *Gordonia* на рост растения. Однако по состоянию фотосинтетического аппарата и активности пероксидаз в корневых экссудатах отмечены различающиеся реакции растений на комбинированный стресс. Существенные изменения происходили в процессах накопления никеля в органах растений: в присутствии н-гексадекана и особенно бактерии увеличивалась аккумуляция никеля в надземной части сорго – ТФ повышался более чем в 2 раза. Полученные результаты дают обоснование целесообразности использования штамма *Gordonia* sp. N7 как технологического приема, способствующего процессу фиторемедиации по извлечению никеля из загрязненного грунта с помощью *Sorghum bicolor*. В то же время, необходимо отметить, что выявленный эффект следует учитывать в сельскохозяйственном кормопроизводстве, поскольку он свидетельствует о повышении загрязнения растительной продукции тяжелым металлом.

Ключевые слова: *Sorghum bicolor*, *Gordonia* sp., аккумуляция никеля, биомасса, н-гексадекан, пероксидазная активность, смешанные загрязнения, фиторемедиация, фотосинтетические пигменты

DOI: 10.31857/S0015330324030108, EDN: NLXXVF

ВВЕДЕНИЕ

Сорго веничное (*Sorghum bicolor* L. Moench) является технической культурой, в связи с чем его использование в качестве растения-фиторемедианта привлекает особое внимание. Этому также способствуют такие его характеристики,

как устойчивость к неблагоприятным экологическим факторам, в первую очередь к засухе, рост на некачественных и засоленных почвах, обильная биомасса и глубоко проникающая корневая система [1]. В сочетании с этими особенностями высокое содержание сахара и способность поглощать тяжелые металлы [2] делает это растение одним из лучших кандидатов для многоцелевого использования в биоэкономике – для фиторемедиации загрязненных земель и для производства биоэтанола или биогаза [3]. По имеющимся литературным данным сорго обладает хорошим потенциалом фитостабилизации, накапливая Ni²⁺ преимущественно на уров-

Сокращения: АБТС – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфонокислоты) диаммониевая соль, ДАФ – 2,7-диаминофлуорен, ИТ – индекс толерантности, ИТП – индекс толерантности побегов, ИТК – индекс толерантности корней, ИТБ – индекс толерантности общей биомассы, ОДА – о-дианизидин, ТФ – транслокационный фактор, PGP – plant-growth promoting (стимулирующие рост растений), PGPR – plant-growth promoting rhizobacteria (ризобактерии, стимулирующие рост растений).

не корней [1, 2]. Несмотря на то, что транслокация этого металла в надземную часть невелика, благодаря высокой продуктивности сорго по зеленой биомассе — использование посевов этого растения в фиторемедиационной технологии способно обеспечить значительное удаление никеля из загрязненной почвы.

В последние годы появились работы, свидетельствующие о высоком потенциале ризобиоты сорго в плане деградации целого ряда органических поллютантов [1]. Это позволяет говорить об эффективности направленного формирования растительно-микробных комплексов путем внесения под растение-фиторемедиант микроорганизмов, обладающих деструктивной и/или фитостимулирующей активностью [4]. В последнее время в качестве идеальных кандидатов для биологической деградации углеводов признаются актинобактерии рода *Gordonia* благодаря их способности разлагать широкий спектр органических соединений, устойчивости к металлам и повсеместному распространению в окружающей среде [4–6].

Низкая требовательность сорго к качеству почвы дает основания рассматривать возможность его использования на землях с мультязгрязнением, которым характеризуются большие природные и хозяйственные территории. Одновременное присутствие в почве нескольких поллютантов, например, металлов и углеводов, зачастую приводит к повышению их токсичности и не просто является “отягчающим” обстоятельством для роста большинства растений, но и существенно осложняет процессы самоочищения экосистем и применение технологий рекультивации.

Природным мультязгрязнением является нефть, имеющая в своем составе не только широкий спектр различных углеводов, но и тяжелые металлы [7]. Среди “нефтяных” металлов одним из наиболее значимых в экологическом плане является никель, относящийся к 2 классу опасности. Его содержание в нефти может достигать 100 мг/л [8].

Стрессовые условия, возникающие в загрязненной почве, влекут за собой изменения физиолого-биохимических процессов в растениях, формируя различные защитные реакции на поллютантный стресс. Ростстимулирующие бактерии при этом могут оказывать влияние на развитие и проявления этого стресса. Поскольку в настоящее время бактериальные препараты для стимуляции роста растений и очистки почвы от нефти применяются достаточно широко, представляется необходимым изучение обоснованности внесения подобных препаратов с целью повысить эффективность фиторемедиации при смешанном загрязнении. Вместе с тем, исследование адаптивных откликов растений в условиях

смешанных загрязнений важны для пополнения фундаментальных знаний о стратегии выживания растений и могут помочь в разработке способов более эффективного применения технологии фиторемедиации загрязненных территорий.

Ранее нами выделен и охарактеризован ризосферный штамм *Gordonia* sp. N7, обладающий PGP свойствами, устойчивостью к тяжелым металлам (Cd^{2+} и Ni^{2+}) и деструктивной активностью в отношении углеводов дизельного топлива [9, 10]¹. Проведены исследования с *Sorghum bicolor*, подтвердившие его фиторемедиационный потенциал [11]. Цель настоящей работы — изучение влияния смешанного загрязнения (никель + н-гексадекан) и инокуляции штаммом *Gordonia* sp. на ростовые и физиолого-биохимические характеристики фиторемедианта *Sorghum bicolor*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семенной материал сорго веничного (*Sorghum bicolor* L. Moench). был получен из ФГБНУ РосНИИСК “Россорго” (г. Саратов). Стерилизацию семян осуществляли гипохлоритом натрия (торговое название “Белизна”) в течение 20 мин после предварительной обработки мыльным раствором, затем трижды проводилась отмывка стерильной водопроводной водой. Стерильность проверялась путем проращивания семян на мясо-пептонном агаре в течение 2 сут.

Растения выращивали в модельных системах, представляющих собой колбы Эрленмейера (250 мл), заполненные 150 г стерилизованного крупного кварцевого песка (2 мм), на который помещали по 10 стерильных проросших семян сорго. Культивирование проводили в контролируемых условиях фитокомнаты в течение 3 недель при температуре 24/20°C и относительной влажности воздуха 70%. Продолжительность светового периода составляла 14, темного — 10 ч, освещенность 8000 Люкс. Полив растений осуществляли средой Ruakara [12] до 80% от полной влагоемкости, определяя необходимое количество жидкости взвешиванием сосудов с растениями. Каждый вариант имел 5 повторностей.

Сорго культивировали в присутствии модельных загрязнителей н-гексадекана, широко используемого в качестве представителя н-парафинов в исследованиях по биодеградации нефти, и никеля — тяжелого металла, являющегося одновременно распространенным токсикантом и микроэлементом.

Перед посевом растений в каждую колбу с песком вносили загрязнители. Никель — из расчета 20 мг/кг (0.34 мМ) в виде раствора сульфата

¹ В указанных источниках штамм обозначен до его реклассификации как *Rhodococcus ruber* N7.

никеля, что соответствует 5 ПДК этого металла в почве [13]; н-Гексадекан (ч, ООО “Вектон”) – до концентрации 5 г/кг. После загрязнения песок тщательно перемешивали и через сутки осуществляли посев семян сорго.

В качестве микроорганизма-инокулянта использовали штамм *Gordonia* sp. N7 (IBPPM 496) из “Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН” (collection.ibppm.ru). Штамм выделен нами ранее из ризосферы тростника южного (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud.), произрастающего на загрязненной нефтью и тяжелыми металлами почве. Идентификация микроорганизма осуществлена на основании результатов анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (GenBank accession number OR157944), а также культуральных, морфологических и физиолого-биохимических характеристик. Авирулентность подтверждена в опытах на белых мышах. Для получения биомассы микроорганизма использовали следующие питательные среды: мясо-пептонный бульон и агар, среда LB, картофельный агар [14].

Бактеризацию проводили на 7 сут роста растений, поливая проростки сорго суспендированной в среде Ruakara 2-суточной LB-агаровой бактериальной культурой *Gordonia* sp. N7, предварительно отмытой физиологическим раствором центрифугированием при 8000 об./мин. Содержание бактерий в песке составляло 10^7 клеток/г.

Опыт ставился в 8 вариантах сочетаний исследуемых факторов (табл. 1) по пять сосудов на каждый вариант опыта. Влияние на сорго поллютантов и бактерий исследовали по следующим показателям: выживаемость растений, биомасса корней и побегов, содержание фотосинтетических пигментов, изоферментный состав и активность пероксидаз в корневых экссудатах. Количество аналитических повторностей составляло три для каждого сосуда.

Выживаемость вычисляли как процент оставшихся в конце эксперимента растений от взошедших. Для определения биомассы у 3-недельных растений высушивали отдельно корни и побеги при 70°C и рассчитывали на 1 растение.

Индекс толерантности (ИТ) высчитывался как % отношения сухого веса растения, выращенного в присутствии стрессора, к биомассе контрольного растения. ИТ определяли для побегов (ИТП), корней (ИТК) и общей биомассы (ИТБ). При этом ИТ > 100% означает стимулирующее воздействие; ИТ = 100% – контроль; ИТ < 100% угнетающее влияние; ИТ = 50% – минимальный желательный объем биомассы при произрастании на загрязненной среде [15, 16].

Накопление никеля в сорго исследовали с использованием атомно-адсорбционного метода (CEM MARS Xpress microwave (Matthews, NC,

Таблица 1. Варианты вегетационного опыта

Шифр варианта опыта	Вносимые компоненты		
	<i>Gordonia</i> sp. N7, 10^7 клеток/г	н-Гексадекан, 5 г/кг	Ni ²⁺ , 0.02 г/кг
Ч	–	–	–
Г	–	+	–
М	–	–	+
ГМ	–	+	+
N7	+	–	–
N7Г	–	+	–
N7М	+	–	+
N7ГМ	+	+	+

Примечание: Ч – чистый вариант, Г – н-гексадекан, М – металл (Ni²⁺), N7 – бактерии *Gordonia* sp. N7.

USA)). Распределение металла по органам растения определяли, вычисляя транслокационный фактор (ТФ) как отношение концентрации металла в побегах к тому же в корнях [16, 23].

Содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов анализировали в последних полностью развернувшихся листьях 3-недельных растений с использованием спектрофотометрического метода [17] на спектрофотометре Evolution 60 (“Thermo Scientific”, США) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см.

Корневые экссудаты получали путем внесения 25 мл стерильной дистиллированной воды в колбы с растениями за 2 сут до окончания эксперимента (3 недели). Через 2 сут полученные корневые экссудаты центрифугировали при 10000 об./мин при температуре 12°C в течение 10 мин для осаждения песка, растительных остатков и микроорганизмов. Чистый раствор корневых экссудатов концентрировали методом ультрафильтрации на Amicon PM – 10 (“Millipore”, США).

Определение активности ферментов проводили на спектрофотометре Evolution 60 (“Thermo Scientific”, США) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта окисления в мин. Удельную активность вычисляли как мкмоль/мин/мг белка и выражали в ед./мг белка. Содержание белка определяли по методу Брэдфорд [18]. В случае невозможности определения концентрации белка активность фермента выражали в условных единицах – мкмоль/мин/г корней (ед./г).

Для определения субстратной специфичности пероксидаз в качестве тестовых субстратов использовали: 2,2'-азино-бис-(3-этилбен-

этиазолин-6-сульфоуксиды) диаммониевую соль (АБТС) – по образованию продукта при 436 нм [19]; *o*-дианизидин (ОДА) – по образованию продукта при 460 нм [20] и 2.7-диаминофлуорен (ДАФ) – по образованию продукта при 600 нм [21].

Пероксидазы в корневых экссудатах сорго выявляли методом неденатурирующего геле-электрофореза в 12% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием ОДА в присутствии H₂O₂ [22].

Для определения влияния никеля на активность пероксидаз была очищена доминирующая (катионная) пероксидаза из корней сорго. Активность определяли в реакции окисления ДАФ как описано выше [21]. В реакционную смесь вносили сульфат никеля в диапазоне концентраций 0–10 мМ (0–590 мг/л).

Все эксперименты выполнялись в пяти биологических и трех аналитических повторностях. Полученные данные подвергали статистической обработке, вычисляя средние значения, для сравнения которых использовали показатели стандартного отклонения, доверительного интервала при $P \leq 0.05$. Вычисления проводили в программе Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных экспериментов получены данные, указывающие на существенные различия в ответных реакциях растений сорго веничного на отдельные биотические и абиотические факторы и их комплексное воздействие.

Выживаемость растений в чистой почве составляла 78% (рис. 1). Присутствие *n*-гексадекана достоверно стимулировало этот показатель на 15% относительно контроля. Влияние отдельно присутствующих никеля и штамма *Gordonia* sp. N7 (М и N7) было на уровне чистого контроля, так же, как и их сочетания с гексадеканом (ГМ и N7Г), однако бактериализация в присутствии никеля (N7М) приводила к заметному ингибированию – выживаемость снижалась почти на 20%. Наибольшим токсическим эффектом обладал вариант с присутствием всех трех стрессоров (N7ГМ) – снижение относительно контроля составило 24%. Полученные данные позволяют заключить, что одновременное воздействие штамма-инокулянта и никеля на выживаемость растений сорго имело аддитивный ингибирующий характер, подавляющий стимулирующий эффект *n*-гексадекана (см. N7М и N7ГМ).

Определение накопления биомассы побегов сорго выявило, что *n*-гексадекан и штамм N7 как по отдельности, так и в сочетании обладали существенным стимулирующим эффектом на этот показатель (на 45–51% относительно чистого контроля) (рис. 2). Никель, напротив, оказывал

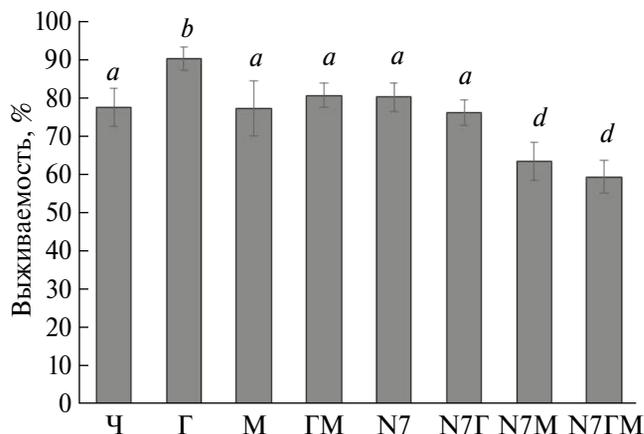


Рис. 1. Выживаемость растений *Sorghum bicolor* в условиях вегетационного опыта. Полосы погрешностей означают доверительный интервал, рассчитанный для $n \geq 5$ при $P \leq 0.05$; одинаковыми буквами отмечены значения, достоверно не отличающиеся между собой при $P \leq 0.05$. Ч – чистый вариант, Г – *n*-гексадекан, М – металл (Ni²⁺), N7 – бактерии *Gordonia* sp. N7.

отчетливое токсическое влияние во всех вариантах с его присутствием (на 31–49%), полностью нивелируя стимулирующее влияние гексадекана и бактериализации.

Аналогичная тенденция стимуляции и ингибирования наблюдалась и в случае биомассы корней сорго (рис. 2). *n*-Гексадекан и штамм N7 повышали этот показатель по-отдельности на 30 и 50% соответственно, а при их совместном присутствии – на 100%. Никель оказывал ингиби-

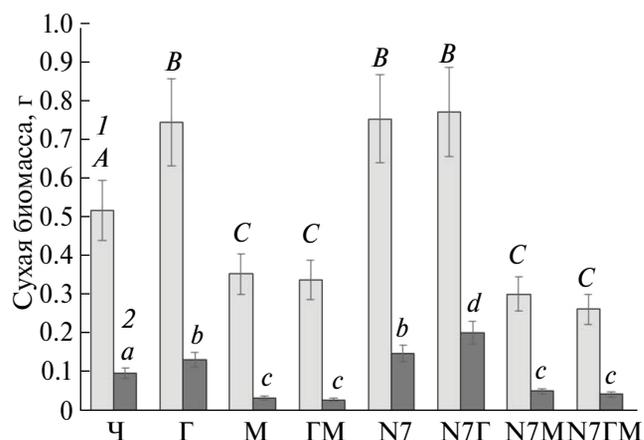


Рис. 2. Биомасса побегов (1) и корней (2) 3-недельных растений *Sorghum bicolor* в разных вариантах вегетационного опыта. Полосы погрешностей означают доверительный интервал, рассчитанный для $n \geq 5$ при $P \leq 0.05$; одинаковыми заглавными буквами отмечены значения веса побегов, достоверно не отличающиеся между собой; одинаковыми строчными буквами отмечены значения веса корней, достоверно не отличающиеся между собой при $P \leq 0.05$. Ч – чистый вариант, Г – *n*-гексадекан, М – металл (Ni²⁺), N7 – бактерии *Gordonia* sp. N7.

рующий эффект во всех вариантах – на 50–70%, также нивелируя стимулирующие воздействие других компонентов.

Влияние исследуемых факторов на общую биомассу растений показало, что бактериализация увеличивала общее производство биомассы сорго на 47%, внесение н-гексадекана – на 43%, а их совместное присутствие – на 59%. Присутствие никеля, напротив, снижало продукцию растительной массы практически на те же значения (табл. 2).

В технологиях фиторемедиации показатели прироста биомассы в виде индексов толерантности (ИТ) используются для оценки эффективности применения растений. По этим показателям н-гексадекан и штамм N7 оказывали стимулирующее влияние на продукцию биомассы растений сорго – ИТ > 100%, особенно при их совместном использовании (ИТК 200) (табл. 2). Никель отчетливо снижал все показатели как индивидуально, так и в комплексе с другими компонентами, полностью нивелируя стимулирующее влияние н-гексадекана и бактериализации. Между тем, присутствие PGP-бактерии несколько повышало устойчивость растений к никелю в случае корней (ИТК 50 для N7M и ИТК 40 для N7GM). Однако следует отметить, что наименьший ИТ для общей биомассы наблюдался в варианте N7GM (ИТБ 49 – минимальный желательный объем биомассы при произрастании на загрязненной среде), указывая на сильное угнетение растений комплексным воздействием исследуемых факторов.

В результате атомно-адсорбционного анализа сухой биомассы побегов и корней сорго веничного было показано, что они аккумулировали никель в количестве от 208.2 до 1081.6 мг на кг сухого веса растений (рис. 3). В корнях никель накапливался значительно в больших количествах, чем в побегах (в 5 раз в случае монозагрязнения). Присутствие н-гексадекана снижало этот показатель почти в 1.5 раза, незначительно повышая накопление в побегах. Инокуляция штаммом *Gordonia* sp. N7 вызывала перераспределение металла в растении: содержание никеля повышалось в побегах независимо от присутствия н-гексадекана на 67–68%

относительно соответствующих вариантов без инокуляции. В корнях наблюдалось понижение накопления металла на 73 и повышение на 17% без н-гексадекана и с н-гексадеканом соответственно. Вероятно, углеводород, являясь дополнительным источником углерода для микроорганизмов, увеличивал их численность, что могло оказывать влияние на проникновение никеля в растение.

Для более четкой технологической трактовки полученных результатов мы использовали показатель транслокационного фактора (ТФ), который является важной характеристикой растений-фиторемедиантов. Значение ТФ меньше 1 свидетельствует об аккумуляции металлов преимущественно в корнях, ТФ больше 1 – в побегах [16, 23]. В нашем случае исходный ТФ никеля составил 0.19 (рис. 3). ТФ вариантов с комплексом поллютантов и бактериализацией повышался в 1.7–2.5 раз, свидетельствуя о смещении накопления металла из корня в надземную биомассу.

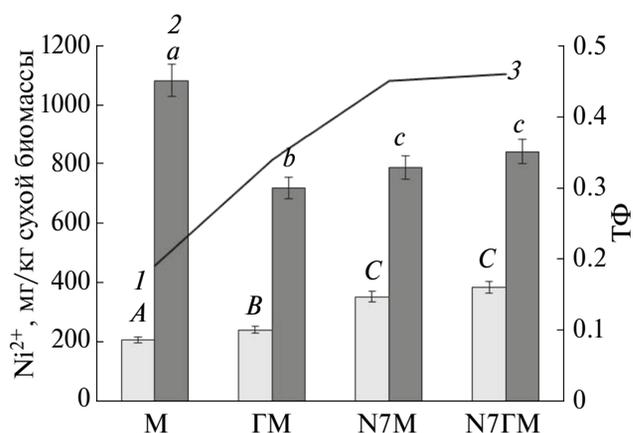


Рис. 3. Накопление ионов никеля в побегах (I) и корнях (2) *Sorghum bicolor* и ТФ никеля (3). Полосы погрешностей означают ошибку среднего значения, не превышающую 5% для $n \geq 5$; одинаковыми заглавными буквами отмечены значения для побегов, достоверно не отличающиеся между собой; одинаковыми строчными буквами отмечены значения для корней, достоверно не отличающиеся между собой при $P \leq 0.05$. Г – н-гексадекан, М – металл (Ni^{2+}), N7 – бактерии *Gordonia* sp. N7.

Таблица 2. Индексы толерантности *Sorghum bicolor* по накоплению биомассы

Показатель, %	Ч	Г	М	GM	N7	N7Г	N7M	N7GM
ИТП	100	145	67	67	147	151	59	51
ИТК	100	130	30	30	150	200	50	40
ИТБ	100	143	62	61	147	159	57	49

Примечание: ИТП – индекс толерантности побегов, ИТК – индекс толерантности корней, ИТБ – индекс толерантности общей биомассы. Ч – чистый вариант, Г – н-гексадекан, М – металл (Ni^{2+}), N7 – бактерии *Gordonia* sp. N7.

Бактеризация в присутствии н-гексадекана повышала показатель ТФ до максимального значения – 0.46.

Изучение влияние никеля на содержание фотосинтетических пигментов показало (табл. 3) снижение концентрации хлорофилла *a* во всех вариантах с его присутствием относительно чистого контроля на 31–54%. н-Гексадекан как единственный стрессор практически не оказывал воздействия. Обращает на себя внимание стимулирующий эффект штамма-инокулянта в чистом грунте (10%) и ингибирующий эффект в его присутствии в вариантах с металлом и н-гексадеканом по отдельности (по 42%) и еще больший при сочетанном действии загрязнителей (54%), однако минимальная концентрация исследуемого пигмента наблюдалась под воздействием всего комплекса стрессоров – 53%.

В случае хлорофилла *b* исследуемые воздействия имели несколько иной характер: н-гексадекан стимулировал его синтез, присутствие только металла не оказывало влияния, но нивелировало стимулирующий эффект н-гексадекана, в то же время бактеризация растений ингибировала синтез хлорофилла *b* во всех вариантах (на 33–56%).

Никель оказывал серьезное воздействие на содержание каротиноидов, снижая его на 25% в отсутствие других факторов и еще больше в сочетании с микроорганизмом (35%), н-гексадеканом (30%) и при комплексе стрессоров (55%). н-Гексадекан, также как и бактеризация, по отдельности не вызывали заметного влияния на каротиноиды, но при совместном присутствии снижали его на 40% (недостаточно), что, вероятно, может быть вызвано воздействием образующихся в этом варианте бактериальных метаболитов разрушения н-гексадекана.

С целью выяснения влияния загрязнителей и штамма-инокулянта на показатели антистрессовой защиты исследовали спектр и активность

экссудиремых корнями сорго ферментов, в частности пероксидаз.

С помощью гель-электрофореза в неденатурирующих условиях установлено, что профиль пероксидаз в корневых экссудатах сорго был представлен как минимум двумя пероксидазами с Rf в диапазоне 0.18–0.70, одна из которых имела 5 изоформ (рис. 4). Обращает на себя внимание появление дополнительной пероксидазы с Rf 0.76 только в варианте N7Г – в случае совместного присутствия н-гексадекана и штамма. Влияние металла выражалось в снижении количества продуцируемых ферментов.

Исследование субстратной специфичности пероксидаз, выделяемых сорго с корневыми экссудатами, показало различные активности этих ферментов по отношению к трем тестовым субстратам: АБТС, ОДА и ДАФ (рис. 5). Пероксидазная активность, определяемая с АБТС, была наиболее высокой в чистых условиях (4.6 мкмоль/мин/г корней) (рис. 5). Наличие в среде загрязнителей существенно ее снижало: на 68% в присутствии н-гексадекана и на 28% – никеля. При их совместном воздействии никель нивелировал влияние н-гексадекана. Инокуляция растения штаммом *Gordonia* sp. N7 наиболее заметно (на 90%) снижала активность фермента вплоть до ее полного ингибирования в присутствии металла и всего комплекса компонентов. В случае анализа с ДАФ (рис. 5) также наблюдалось снижение пероксидазной активности с некоторыми вариациями (на 35–80%), вызванное присутствием загрязнителей и еще в большей степени – бактерий. В случае совместного присутствия штамма и никеля ДАФ-пероксидазная активность не выявлялась.

В отличие от предыдущих тестовых субстратов использование ОДА (рис. 5) обнаружило повышение активности пероксидазы в присутствии никеля в качестве единственного компонента (на 24%). Это, вероятно, отразилось на детектировании пониженной, но достаточно от-

Таблица 3. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях *Sorghum bicolor* (мг/г сырой биомассы)

Пигменты	Варианты опыта							
	Ч	Г	М	ГМ	N7	N7Г	N7М	N7ГМ
Хлорофилл <i>a</i>	0.71 ± 0.06	0.68 ± 0.19*	0.49 ± 0.12*	0.47 ± 0.09*	0.78 ± 0.10	0.41 ± 0.15*	0.41 ± 0.01*	0.33 ± 0.13*
Хлорофилл <i>b</i>	0.27 ± 0.02	0.31 ± 0.11*	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.06	0.18 ± 0.06*	0.14 ± 0.01*	0.19 ± 0.07*	0.19 ± 0.03*
Каротин + ксантофил	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.05	0.15 ± 0.04*	0.14 ± 0.02*	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.01*	0.13 ± 0.04	0.09 ± 0.04*

Примечание. В таблице приведены средние значения ($n \geq 3$) ± стандартное отклонение; звездочкой обозначены значения, достоверно отличающиеся от контроля (Ч) при $P \leq 0.05$. Ч – чистый вариант, Г – н-гексадекан, М – металл (Ni^{2+}), N7 – бактерии *Gordonia* sp. N7.

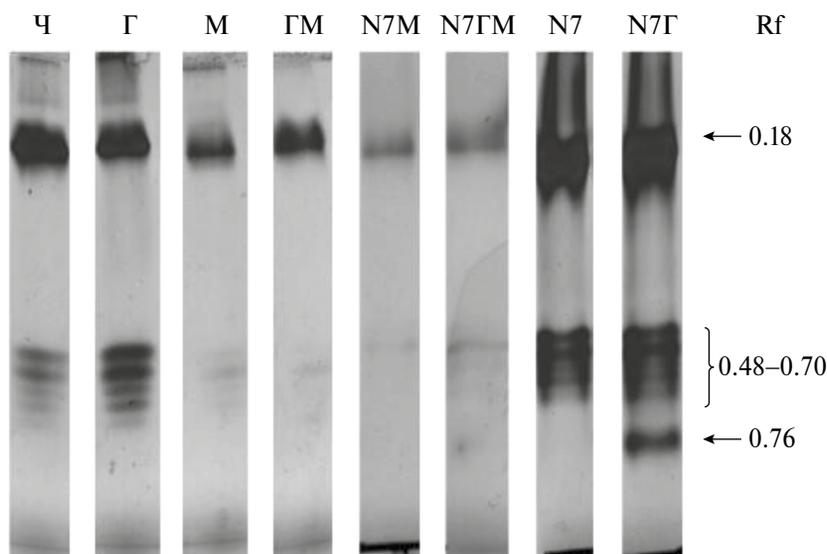


Рис. 4. Спектр пероксидаз в корневых экссудатах *Sorghum bicolor* в присутствии ионов металла (никеля), н-гексадекана и штамма *Gordonia* sp. N7. Ч – чистый вариант, Г – н-гексадекан, М – металл (Ni^{2+}), N7 – бактерии *Gordonia* sp. N7.

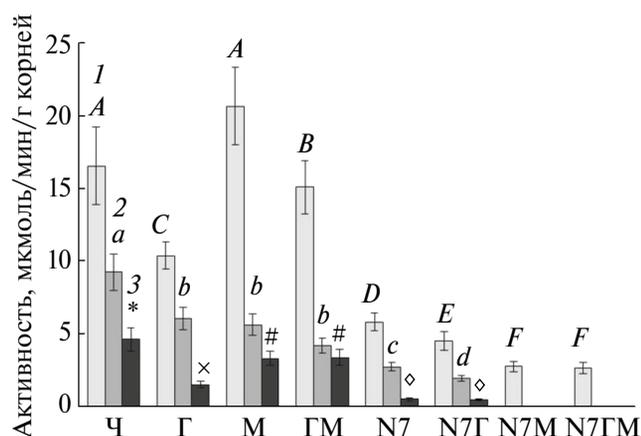


Рис. 5. Активность пероксидаз из корневых экссудатов *Sorghum bicolor* в отношении тестовых субстратов: 1 – ОДА; 2 – ДАФ; 3 – АБТС. Одинаковыми заглавными буквами отмечены значения для ОДА, достоверно не отличающиеся между собой; одинаковыми строчными буквами отмечены значения для ДАФ, достоверно не отличающиеся между собой; одинаковыми символами отмечены значения для АБТС, достоверно не отличающиеся между собой при $P \leq 0.05$. Ч – чистый вариант, Г – н-гексадекан, М – металл (Ni^{2+}), N7 – бактерии *Gordonia* sp. N7.

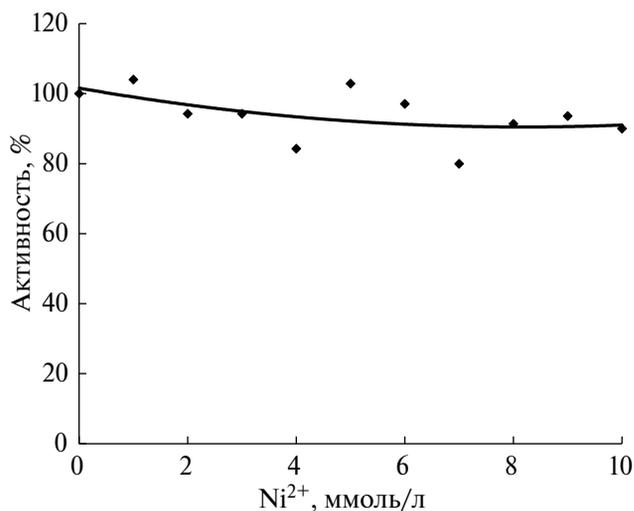


Рис. 6. Влияние никеля в возрастающей концентрации на активность очищенной катионной пероксидазы из корней *Sorghum bicolor* (с ДАФ). По оси ординат активность фермента в % к варианту без никеля. При концентрации никеля 0 мМ активность принимали за 100%.

четливой активности этой пероксидазы в вариантах N7M и N7ГМ, в которых активность других пероксидаз не выявлялась.

Изучение влияния ионов никеля на активность очищенной пероксидазы из корней сорго веничного показало, что в диапазоне концентраций 0–10 мМ (0–590 мг) никель не оказывал заметного влияния на активность фермента (рис. 6). Это позволяет предположить, что металл снижает не активность, а именно

продукцию фермента, отчетливо выявляемую электрофорезом в неденатурирующих условиях (рис. 4).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенных различиях во влиянии индивидуальных загрязнителей и их комплекса на исследованные параметры растения сорго веничного. Бактеризация способствовала лучшему развитию растений в условиях загрязнения, вызывая при этом определенные реак-

ции фотосинтетического аппарата и ферментов антистрессовой защиты сорго. Наконец, повышение ТФ никеля в результате бактеризации явилось отчетливым свидетельством положительного влияния *Gordonia* sp. N7 на фиторемедиационный потенциал сорго.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное нами исследование на примере бинарной смеси никеля и н-гексадекана показало, что сорго вечноное меняет свои биометрические и физиолого-биохимические показатели в условиях комбинированного загрязнения относительно воздействия индивидуальных поллютантов.

Известно, что никель, являясь микроэлементом, в небольших количествах необходим высшим растениям, являясь структурным элементом нескольких металлоферментов, таких как уреазы, супероксиддисмутазы, Ni-Fe гидрогеназа, ацетил-коэнзим-синтаза и др. [24]. Следовательно, он важен для окислительно-восстановительных реакций и осуществления различных клеточных функций. Однако в высоких концентрациях этот металл проявляет токсичность и изменяет нормальный метаболизм растений, вызывая клеточные повреждения и даже гибель [25]. Симптомы отравления никелем у растений включают хлороз, некроз, задержку роста корней и уменьшение площади листьев [24]. В нашем исследовании никель существенно снижал накопление биомассы побегов и корней, сохраняя практически такие же величины ингибирования и при комбинированном внесении загрязнителей.

н-Гексадекан увеличивал биомассу побегов и корней сорго, однако присутствие никеля нивелировало этот эффект. Стимулирующая активность углеводов нефти на рост растений описана в литературе [24, 26]. Ряд авторов связывают ее с усилением биологической активности углеводородокисляющих микроорганизмов и стимулированием метаболических процессов в ризосферной зоне [26]. Однако в нашем случае условия культивирования растений изначально стерильные, что предполагает наличие иных причин. Следует отметить, что механизмы влияния именно н-гексадекана или других индивидуальных алифатических углеводов на растения в литературе представлены довольно скупо. Известно, что н-гексадекан способен проникать в ткани растений и даже подвергаться там биохимическим модификациям под влиянием цитохрома P450 и пероксидаз [27].

Напротив, у микроорганизмов процессы контактов с н-парафинами и их деградации исследованы в достаточной степени [28]. Поскольку для инокуляции растений нами ис-

пользовался штамм деструктор н-гексадекана *Gordonia* sp. N7, необходимо учитывать, что он взаимодействует с углеводородом как с питательным субстратом по известным механизмам: либо путем адгезии, либо солюбилизации. Оба варианта описаны для актинобактерий, в том числе и для рода *Gordonia*. В присутствии гидрофобных субстратов, в частности н-парафинов, эти бактерии повышают гидрофобность своей поверхности и сродство к углеводородам за счет высокого содержания липидов в клеточной стенке, либо синтезируют биосурфактанты, повышая биодоступность соединений за счет их эмульгирования [28, 29]. По этой причине воздействие н-гексадекана на растение в присутствии модифицирующих его бактерий может измениться.

Ионы никеля также способны взаимодействовать как с корнями растения, так и с бактериями, проявляя в определенной концентрации по отношению к ним токсические свойства. Интересным является тот факт, что синтезируемые при культивировании актинобактерий в углеводородсодержащей среде биосурфактанты, являясь потенциальными металлохелаторами, связываются с ионами тяжелых металлов, тем самым препятствуя их поступлению в бактериальные клетки, что в свою очередь сопровождается повышением устойчивости последних к данным ксенобиотикам. Например, резистентность к ионам тяжелых металлов актинобактерий, культивируемых в присутствии н-гексадекана, в 2–4 раза выше по сравнению с таковой культур, выращенных в богатой питательной среде [30].

Таким образом, все воздействующие на растения компоненты находятся в активном взаимодействии друг с другом, что меняет как их собственные характеристики, так и реакции растений. Вполне вероятно, что изменение поверхностных свойств бактерий в присутствии н-гексадекана и никеля может способствовать изменению контактных взаимодействий PGP-бактерии, каковой является *Gordonia* sp. N7, с корнями растения. Полученные нами результаты косвенно свидетельствуют об этом. Особенно ярко это выразилось на примере влияния никеля и бактерии на прирост биомассы сорго. Бактеризованные растения в чистых условиях накапливали значительно больше биомассы корней и побегов относительно контроля. Это может являться следствием проявления микроорганизмом-инокулянт активностью АЦК-деаминазы, которая, как известно, снижает образование фитогормона этилена и тем самым стимулирует рост растений [31]. В присутствии никеля эта стимулирующая активность штамма нивелировалась и наблюдалось существенное ингибирование роста побегов и корней, что можно объяснить ингибированием тяжелыми металлами

активности бактериальной АЦК-деаминазы [31]. Однако если сравнить варианты индивидуального присутствия никеля и совместно с бактериальным штаммом, прирост биомассы корня в последнем случае недостоверно, но выше, что с осторожностью позволяет говорить о “смягчении” бактериями токсичности никеля в отношении корней. В литературе также описаны данные о проявлении стимуляции роста растений природным ризобактериальным изолятом в условиях мультзагрязнения металлами [32].

Обобщая вышеуказанные данные и используя такой показатель, как общее производство биомассы растений, можно заключить, что у сорго он повышался относительно контроля под влиянием исследуемых факторов в следующем ряду: н-гексадекан (43%), инокуляция штаммом (47%), н-гексадекан + штамм *Gordonia* sp. (59%). Никель, напротив, во всех вариантах его присутствия снижал этот показатель на 50–70%. Вычисленный нами на основе показателей продукции растительной биомассы индекс толерантности (ИТ), характеризующий степень устойчивости растения к стрессору, определил характер влияния никеля на сорго как сильное угнетение, незначительно варьирующее в присутствии других компонентов.

Важным аспектом нашей работы явилось выяснение поглощения растениями сорго ионов никеля, характеризующего фиторемедиационный потенциал растений [32]. Этот металл относится к элементам с высокой способностью проникновения в растение, но особый интерес с точки зрения технологических процессов представляло определить локализацию поглощенного никеля, поскольку надземную часть растений легче удалять с очищаемого участка.

Показано, что накопление никеля за 3 недели роста сорго на никельсодержащем песке происходило преимущественно в корнях. Дополнительные вносимые компоненты влияли на этот процесс. Вычисленный нами для всех вариантов опыта показатель ТФ, на основании которого можно судить о преимущественном накоплении металлов в корнях или побегах [16, 23] показал, что присутствие углеводородного загрязнения, а также инокуляция растений RGP-бактериями не только увеличивали содержание никеля в растении, но и смещали его локализацию в надземную часть. Максимальное значение ТФ получено в варианте никель + бактериализация + гексадекан, в котором бактерии имели дополнительный источник углерода для роста, увеличивающий их численность. Подобный эффект описан в работе [33], авторы которой считают, что повышение содержания никеля в надземных частях растений происходит за счет выделения устойчивыми к металлу ризосферными бактериями сидерофоров и ор-

ганических кислот, в комплексе с которыми может осуществляться дальний транспорт ионов никеля по сосудам ксилемы.

Одним из самых значимых физиолого-биохимических показателей состояния растения является функционирование его фотосинтетического аппарата, который в условиях стрессового воздействия реагирует каскадом защитных реакций [34]. Негативное влияние тяжелых металлов связывают с их прямым ингибирующим воздействием на активность ферментов биосинтеза зеленых пигментов, что сказывается на содержании хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов. Кроме того, нарушение биосинтеза хлорофиллов в присутствии тяжелых металлов, в том числе Ni^{2+} , может быть вызвано замещением ионов магния ионами этих металлов в молекулах пигмента [35].

В наших экспериментах никель отрицательно влиял на содержание хлорофилла *a* и каротиноидов, не оказывая воздействия на хлорофилл *b*. Присутствие только н-гексадекана проявлялось в повышении уровня хлорофилла *b*. Воздействие комплекса загрязнителей практически было равнозначным влиянию никеля, нивелирующего воздействие н-гексадекана. Интересно, что инокуляция актинобактериями рода *Gordonia* (штаммом N7) явилась серьезным ингибирующим фактором, существенно снижающим содержание исследованных фотосинтетических пигментов в листьях сорго. При этом присутствие загрязнителей в основном усиливало этот эффект. Наибольшее снижение хлорофилла *a* и каротиноидов – более чем в 2 раза – произошло под воздействием композиции всех трех компонентов. Между тем, по литературным данным инокуляция семян пшеницы эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* снижала токсический эффект никеля, что проявлялось в сохранении фотосинтетической активности и лучших показателях роста растений [36].

Хлорофилл *a* связан с реакционными центрами фотосистем, а форма *b* – со светособирающим комплексом фотосистемы II. Вызванное бактериализацией снижение содержания хлорофилла *b* может иметь в своей основе существенные изменения процессов поглощения света [34]. Об этом же свидетельствует уменьшение содержания каротиноидов, участвующих в нейтрализации активных форм кислорода в стрессовых условиях.

Представленные в литературе данные как положительного [37], так и отрицательного [38] влияния инокуляции RGP-бактериями растений на содержание фотосинтетических пигментов, предполагают, что распознавание хозяин-бактерия приводит к стресс-специфической модуляции реакции корня и дифференциальному независимому от стресса влиянию на фотосинтез [38].

Существенный интерес в ответных реакциях растений на стрессоры представляют пероксидазы, экссудлируемые корнями. Физиологические функции этих ферментов связаны с механизмами защиты, метаболизмом ауксина и биосинтезом полимеров клеточной стенки, таких как лигнин и суберин, выполняющих функцию физического барьера при воздействии биотических и абиотических стрессовых факторов. Кроме того, с пероксидазами сорго связывают его термотолерантность и устойчивость к грибным инфекциям [39]. Широкая субстратная специфичность пероксидаз позволяет рассматривать их как важный инструмент детоксикации/деградации загрязнителей окружающей среды [11].

Как правило, пул ферментов, экссудлируемых корнями, представлен несколькими ферментами и их изоформами. Считается, что именно варьируя изоформный состав пероксидаз растение обеспечивает необходимые биохимические реакции в ответ на какой-либо стресс. При этом, множественные молекулярные формы пероксидаз отличаются по ряду физико-химических свойств и локализации [40].

Полученные нами результаты показали присутствие в корневых эксудатах сорго в заданных условиях эксперимента как минимум двух пероксидаз, одна из которых имела несколько изоформ. Наибольший интерес представляет появление еще одной пероксидазы с самой высокой электрофоретической подвижностью (0.76) в варианте одновременного присутствия н-гексадекана и бактерий рода *Gordonia* N7, причем, добавление никеля к этим компонентам существенно уменьшало активность этой формы, но полного ингибирования не происходило. Функция выявленной пероксидазы не ясна, однако в связи с тем, что штамм-инокулянт является деструктором н-гексадекана, можно предположить, что это – реакция растения на биосурфактанты, продуцируемые бактериями в присутствии гидрофобного субстрата, либо на метаболиты и активные формы кислорода (АФК), образующиеся при микробном окислении углеводорода.

Активность пероксидаз сорго, исследованная нами в концентрированных корневых эксудатах, различалась в зависимости от использованного тестового субстрата. Однако во всех вариантах тенденция была одинаковой: активность относительно чистого контроля снижалась в присутствии как загрязнителей, так и штамма-инокулянта, достигая в отдельных случаях практически полного ингибирования (при воздействии всех трех компонентов). Присутствие бактерий вызывало наиболее понижающий эффект, причем, как индивидуально, так и в еще большей степени – в композиции с другими компонентами. Исключением явились резуль-

таты с тестовым субстратом ОДА, в которых никель (индивидуально) повышал пероксидазную активность на 25%. В целом, можно заключить, что из всех исследуемых факторов наиболее влияющим на пероксидазную активность корневых эксудатов сорго являлся биотический фактор – инокуляция штаммом *Gordonia* sp. N7. Возможно, что такой ответ растения на ризосферную бактерию, охарактеризованную нами как PGPR, является особенностью ее взаимодействия с корнями сорго, понижающего стрессовый отклик растения. Однако следует учитывать, что проведенный анализ дает картину активности ферментов на конец эксперимента – на 20 сут. Вполне вероятно, что в этот период растение уже адаптировалось к стрессовым условиям.

В присутствии никеля также отмечено снижение активности пероксидаз с использованием в качестве тестовых субстратов ДАФ и АБТС. Относительно ОДА этот эффект отсутствовал. В то же время, отдельным экспериментом показано, что никель в широком диапазоне концентраций не влиял на активность очищенной ДАФ-пероксидазы. Это может объясняться тем, что в корневых эксудатах содержится широкий набор пероксидаз и их изоформ, которые, естественно, имеют различное сродство к тестовым субстратам и по-разному подвержены влиянию никеля.

Таким образом, подводя итог проведенному эксперименту, можно констатировать, что исследованные стрессоры оказывали существенное влияние как на ростовые, так и физиолого-биохимические характеристики *Sorghum bicolor*. При индивидуальном присутствии их воздействие выглядело следующим образом.

н-Гексадекан повышал выживаемость сорго, биомассу корней и побегов, ИТ, накопление никеля в побегах, ТФ, содержание хлорофилла *b*, понижал активность пероксидаз в корневых эксудатах.

Бактеризация актинобактериями рода *Gordonia* N7 повышала прирост биомассы, ИТ, накопление никеля в побегах, ТФ, понижала содержание хлорофилла *b*, активность пероксидаз в корневых эксудатах.

Никель оказывал практически на все изученные параметры негативное воздействие: уменьшал биомассу, понижал ИТ, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов, понижал активность пероксидаз в корневых эксудатах, аккумуляровался в основном в корнях сорго.

Добавление других компонентов оказывало влияние на изучаемые параметры, однако токсическое воздействие никеля было доминирующим и нивелировало эффекты других факторов, например, стимулирующее влияние н-гексадекана и бактерий на прирост растительной биомассы. Тем не менее, влияние н-гексадекана и

ризосферного штамма *Gordonia* sp. N7 на эффекты, вызванные никелем в сравнении с его индивидуальными показателями, были весьма отчетливыми.

В присутствии бактерий влияние никеля на растения менялось по всем показателям за исключением прироста биомассы: снижалась выживаемость, существенно повышался ИТ корней, ТФ увеличивался более чем в 2 раза, смещая накопление никеля в побеги, пероксидазная активность снижалась почти в 7 раз, уменьшалось содержание всех фотосинтетических пигментов, особенно хлорофилла *b*.

н-Гексадекан в меньшей степени, но влиял на ингибирующее воздействие никеля, отчетливо повышая ТФ и понижая пероксидазную активность в корневых экссудатах по отдельным тестовым субстратам.

Таким образом, смоделированный нами комбинированный стресс, сочетающий абиотические факторы с биотическим, продемонстрировал существенный эффект их сочетания на растения сорго, особенно со штаммом *Gordonia* sp. N7. Его внесение вызывало как положительные, так и отрицательные реакции сорго величественного, свидетельствующие об особенностях коммуникаций макро- и микропартнеров в условиях загрязненной среды и возможном участии в адаптивных реакциях растения в экстремальной среде. Полученные результаты дают обоснование эффективности использования актинобактерий как технологического приема, способствующего процессу фиторемедиации по извлечению никеля из загрязненного грунта. В то же время, необходимо отметить, что выявленный эффект следует учитывать в сельскохозяйственном кормопроизводстве, поскольку он свидетельствует о загрязнении растительной продукции тяжелыми металлами. Эти два аспекта взаимоисключаемы в названных технологических процессах и крайне важны в фундаментальном плане по исследованию влияния мультизагрязнений на растения.

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

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sathya A., Kanaganahalli V., Srinivas Rao P., Gopalakrishnan S.* Cultivation of sweet sorghum on heavy metalcontaminated soils by phytoremediation approach for production of bioethanol // In: M.N.V. Prasad, ed., *Bioremediation and Bioeconomy*, Amsterdam: Elsevier, 2016. P. 271.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802830-8.00012-5>
2. *De Bernard A., Casucci C., Businelli D., D'Amato R., Beone G. M., Fontanella M.C., Viscetti C.* Phytoremediation potential of crop plants in countering nickel contamination in carbonation lime // *Plants*. 2020. V. 9. P. 580.
<https://doi.org/10.3390/plants9050580>
3. *Rao P.S., Reddy B.V.S., Reddy Ch.R., Blümmel M., Kumar A.A., Rao P.P., Basavaraj G.* Utilizing co-products of the sweet sorghum based biofuel industry as livestock feed in decentralized systems // In: FAO. 2012. *Biofuel co-products as livestock feed – Opportunities and challenges*, edited by Harinder P.S. Makkar. Rome. P. 229.
4. *Hong S.H., Cho K.-S., Ryu H., Kim J.* Rhizoremediation of diesel-contaminated soil using the plant growth-promoting rhizobacterium *Gordonia* sp. S2RP-17 // *Biodegradation*. 2011. V. 22. P. 593.
<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9432-2>
5. *Lo Piccolo L., De Pasquale C., Fodale R., Puglia A.M., Quatrini P.* Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. strain SoCg in degradation of solid n-alkanes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 1204.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02180-10>
6. *Litvinenko L.V.* Ability of the *Dietzia*, *Gordonia* and *Rhodococcus* actinobacteria to accumulate nickel ions // *Microbiol.* 2019. V. 88. P. 207.
<https://doi.org/10.1134/S0026261719020061>
7. *Atagana H.I.* Bioremediation of co-contamination of crude oil and heavy metals in soil by phytoremediation using *Chromolaena odorata* (L) King & H.E. Robinson // *Water Air Soil Pollut.* 2011. V. 215. P. 261.
<https://doi.org/10.1007/s11270-010-0476-z>
8. *Пиковский Ю.И.* Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. Под ред. М.А. Глазовской. М.: Наука, 1988. С. 7.
9. *Muratova A., Lyubun Y., German K., Turkovskaya O.* Effect of cadmium stress and inoculation with a heavy-metal-resistant bacterium on the growth and enzyme activity of *Sorghum bicolor* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015. V. 22. P. 16098.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4798-7>
10. *Бондаренкова А.Д.* Стимулирующие рост растений ризобактерии в фиторемедиации почв, загрязненных углеводородами // Дисс. ... канд. биол. наук. Саратов: ИБФРМ РАН, 2009. 162 с.
11. *Dubrovskaya E., Pozdnyakova N., Golubev S., Muratova A., Grinev V., Bondarenkova A., Turkovskaya O.* Peroxidases from root exudates of *Medicago sativa* and

- Sorghum bicolor*: catalytic properties and involvement in PAH degradation // *Chemosphere*. 2017. V. 169. P. 224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.027>
12. *Smith G.S., Johnston C.M., Cornforth I.S.* Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture // *New Phytol.* 2006. V. 94. P. 537. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1983.tb04863.x>
 13. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве Гигиенические нормативы ГН 2.1.7.2041-06.
 14. *Герхардт Ф.* Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1983. Т. 3. 536 с.
 15. *Ali N.A., Berna M.P., Ater M.* Tolerance and bioaccumulation of cadmium by *Phragmites australis* grown in the presence of elevated concentrations of cadmium, copper and zinc // *Aquat. Bot.* 2004. V. 80. P. 163. <https://doi.org/10.1016/J.AQUABOT.2004.08.008>
 16. *Елизарьева Е.Н., Янбаев Ю.А., Кулагин А.Ю.* Особенности выбора фиторемедиационных технологий очистки почв и сточных вод от ионов тяжелых металлов // *Вестник удмуртского университета. Биология. Науки о Земле.* 2016. Т. 26. С. 7.
 17. Методы биохимического анализа растений / В.В. Полевой и Г.Б. Максимов. Л.: Изд-во Ленинградского университета. 1978. 192 с.
 18. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye-binding // *Anal Biochem.* 1976. V. 72. P. 248. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
 19. *Niku-Paavola M.L., Karhunen E., Salola P., Raunio J.* Ligninolytic enzymes of white-rot fungus *Phlebia radiata* // *Biochem J.* 1988. V. 254. P. 877. <https://doi.org/10.1042/bj2540877>
 20. *Bartha R., Bordeleau L.* Cell-free peroxidases in soil // *Soil Biol. Biochem.* 1969. V. 1. P. 139. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90004-2)
 21. *Criquet S., Joner E., Leglise P., Leyval C.* Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.) // *Biotechnol. Lett.* 2000. V. 22. P. 1733. <https://doi.org/10.1023/A:1005604719909>
 22. *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>
 23. *Cao A., Cappai G., Carucci A., Muntoni A.* Selection of plants for zinc and lead phytoremediation // *J. Environ. Sci. Health.* 2004. V. 39. P. 1011. <https://doi.org/10.1081/ese-120028410>
 24. *Ahmad M.S.A., Ashraf M.* Essential roles and hazardous effects of nickel in plants. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*, Whitacre D.M. (ed.). New York: Springer, 2011. P. 125. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0668-6_6
 25. *Seregin I.V., Kozhevnikova A.D.* Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2006. V. 53. P. 257. <https://doi.org/10.1134/S1021443706020178>
 26. *Khan S., Afzal M., Iqbal S., Khan Q.M.* Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils // *Chemosphere.* 2013. V. 90. P. 1317. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.045>
 27. *Vega-Jarquín C., Dendooven L., Magaña-Plaza I., Thalasso F., Ramos-Valdivia A.* Biotransformation of n-hexadecane by cell suspension cultures of *Cinchona robusta* and *Dioscorea composite* // *Environ. Toxicol. Chem.* 2001. T. 20. P. 2670. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201203>
 28. *Solyanikova I.P., Golovleva L.A.* Hexadecane and hexadecane-degrading bacteria: mechanisms of interaction // *Microbiology.* 2019. V. 88. P. 19. <https://doi.org/10.1134/S0026261718060152>
 29. *Rubtsova E.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B.* Effect of cultivation conditions on the adhesive activity of rhodococci towards n-hexadecane // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 501. <https://doi.org/10.1134/S0003683812050110>
 30. *Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Kostina L.V.* Adaptive mechanisms of nonspecific resistance to heavy metal ions in alkanotrophic actinobacteria // *Rus. J. Ecol. (Ekologiya).* 2013. P. 115. <https://doi.org/10.1134/S1067413613020082>
 31. *Белимов А.А., Тихонович И.А.* Микробиологические аспекты устойчивости и аккумуляции тяжелых металлов у растений (обзор) // *Сельскохозяйственная биология.* 2011. № 3. С. 10.
 32. *Oh K., Cao T.H., Cheng H.Y., Liang X.H., Hu X.F., Yan L.J., Yonemochi S., Takahi S.* Phytoremediation potential of sorghum as a biofuel crop and the enhancement effects with microbe inoculation in heavy metal contaminated soil // *J. Biosci. Medic.* 2015. V. 3. P. 9. <http://dx.doi.org/10.4236/jbm.2015.36002>
 33. *Abou-Shanab R., Delorme T.A., Angle J.S., Chaney R.L., Ghanem K., Moawad H., Ghazlan H.A.* Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale* // *Int. J. Phytoremediation.* 2003. V. 5. P. 367. <https://doi.org/10.1080/16226510390268766>
 34. *Kreslavski V.D., Carpentier R., Klimov V.V., Murata N., Allakhverdiev S.I.* Molecular mechanisms of stress resistance of photosynthetic apparatus // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A Membrane and Cell Biology.* 2007. V. 1. P. 185. <https://doi.org/10.1134/S1990747807030014>
 35. *Küpper H., Küpper F., Spiller M.* Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants // *J. Exp. Bot.* 1996. V. 47. P. 259. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.2.259>
 36. *Смирнова Ю.В., Кураמיшина З.М., Гамоненко О.В.* Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на содержание фотосинтетических пигментов в растениях пшеницы при воздействии никеля // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн.* 2018. № 12. С. 54. <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/6661>.

37. *Bashan Y., Bustillos J.J., Leyva L.A., Hernandez J. P., Bacilio M.* Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense* // *Biol. Fertil. Soils*. 2006. V. 42. P. 279. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0025-x>
38. *Czarnes S., Mercier P.E., Lemoine D.G., Hamzaoui J., Legendre L.* Impact of soil water content on maize responses to the plant growth promoting rhizobacterium *Azospirillum lipoferum* CRT1 // *J. Agro Crop Sci.* 2020. V. 206. P. 505. <https://doi.org/10.1111/jac.12399>
39. *Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И.* Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // *Успехи биол. химии*. 2006. Т. 46. С. 303.
40. *Граскова И.А., Боровский Г.Б., Владимирова С.В., Романенко А.С., Войников В.К.* Изоферментные спектры пероксидаз картофеля при патогенезе кольцевой гнили // *Доклады РАН*. 2002. Т. 384. № 6. С. 844.