

Журналу 70 лет!



ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 71, номер 4, 2024

ОБЗОРЫ

- Фитомелатонин как элемент гормональной системы растений
В. В. Кузнецов, И. А. Бычков, Н. В. Кудрякова 377
- Пограничные клетки корневого апекса: роль в стратегиях адаптации
и корневом иммунитете
С. А. Пятина, Е. И. Шишацкая, Н. Г. Мензянова 398
-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Влияние эндофитных бактерий *Bacillus velezensis* M66
на транскрипционную активность генов системы РНК-интерференции
при развитии защитных реакций против возбудителя фитофтороза
Phytophthora infestans (Mont.) de Bary
А. В. Сорокань, В. Ф. Габдрахманова, И. С. Марданишин, И. В. Максимов 409
- Морфологические и физиолого-биохимические свойства меланизированного таллома
лишайника *Cetraria islandica*
А. Г. Даминова, Е. И. Галеева, Д. Ф. Рахматуллина, Л. В. Викторова, Ф. В. Минабаева 418
- Сравнительный анализ компонентного состава эфирных масел кожуры
плодов лимона сорта Ташкентский при выращивании в закрытом грунте
в различных природно-климатических зонах
Н. В. Иванов, Д. С. Аникина, А. В. Навров 426
- Длительное пассирование и характеристика каллусных культур клеток *Melissa officinalis* L.
Н. А. Егорова, О. В. Якимова, И. В. Белова 436
- Компонентный состав фракций стеринов тонопласта в условиях стресса,
вызванного ионами меди
И. С. Капустина, Е. В. Спиридонова, Н. В. Озолина, А. В. Третьякова, В. В. Гурина 446
- Фенольные соединения *Rhodiola algida* (Ledeb.) Fisch. & С.А. Меу.:
новые гликозиды гербацетина, ВЭЖХ-МС профиль и орган-специфичное распределение
Д. Н. Оленников, А. С. Прокопьев 455
- Определение полифенольного комплекса в *Reynoutria japonica* Houtt.
методом тандемной масс-спектрометрии
М. П. Разгонова, Е. И. Черевач, Н. С. Кириленко, Е. Н. Демидова, К. С. Голохваст 465
- Получение препарата, обогащенного Zn-феофитином, из листьев пшеницы *Triticum aestivum* L.
М. С. Хрустин, Т. Н. Смолова 475
- Накопление пролина, флавоноидов и органических кислот в листьях кресс-салата
в условиях сощелочного стресса
А. К. Чернышева, О. З. Еремченко, К. И. Боталова 482
-

УДК 581.1

ФИТОМЕЛАТОНИН КАК ЭЛЕМЕНТ ГОРМОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. В. В. Кузнецов^а, И. А. Бычков^а, Н. В. Кудрякова^{а,*}

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия
*e-mail: nvkudryakova@mail.ru

Поступила в редакцию 04.06.2024 г.

После доработки 05.06.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), гормон животных, антиоксидант и регуляторная молекула, привлекает все большее внимание биологов. Мелатонин, открытый в растениях в 1995 г. и позднее названный фитомелатонином (ФМТ), регулирует многие этапы онтогенеза растений, начиная от прорастания семян и заканчивая процессом старения. ФМТ является одним из наиболее мощных антиоксидантов растительной клетки. Многочисленные экспериментальные данные показывают, что ФМТ повышает устойчивость растений в условиях действия как абиотических, так и биотических стрессов. В регуляции физиологических процессов он взаимодействует практически со всеми известными в настоящее время фитогормонами. Сейчас довольно хорошо изучен биосинтез ФМТ, его полифункциональная активность, открыт первый рецептор и некоторые компоненты цепи его сигналинга. Все это позволяет считать ФМТ новым гормоном растений.

Ключевые слова: мелатонин, сигналинг, стресс, фитогормоны, фитомелатонин, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0015330324040012, **EDN:** MOJKN

ВВЕДЕНИЕ

Мелатонин получил свое название от греческого слова *melano* (черный или темный) и *serotonin*, поскольку он может осветлять цвет кожи некоторых рыб, рептилий и амфибий [1]. Мелатонин появился в бактериях примерно 2.5–3.5 млрд лет назад [2], когда земная атмосфера начала обогащаться молекулярным кислородом, благодаря его высвобождению фотосинтезирующими бактериями. Несмотря на очень долгую эволюционную историю и множество функций, химическая структура мелатонина осталась неизменной в течение миллиардов лет. Возможно, мелатонин появился в первую очередь как антиоксидант и поглотитель свободных радикалов на ранних стадиях развития фотосинтезирующих прокариотических бактерий [3]. Предполагается, что мелатонин существовал в бактериях до процесса эндосимбиоза, когда цианобактерии и α-протеобактерии были поглощены примитивными эукариотами и в ходе эволюции превратились в хлоропласты и митохондрии, соответственно. Таким обра-

зом, все одноклеточные и многоклеточные организмы производят мелатонин в этих органеллах [3, 4], однако его функции, путь биосинтеза, места локализации и механизмы регуляции разошлись. В ходе эволюции мелатонин не только сохранил свою основную функцию антиоксиданта, но и приобрел другие важные биологические свойства.

В 1958 г. Лернер впервые выделил мелатонин из эпифиза быка [1], и в последующие годы была показана огромная роль мелатонина в жизни животных и человека. В 1988 г. мелатонин был найден у одноклеточной фотосинтезирующей водоросли *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge, а в 1995 г. две независимые научные группы одновременно сообщили об обнаружении мелатонина в сосудистых растениях [5, 6]. Мелатонин растений в 2004 г. предложили называть фитомелатонином.

В настоящее время исследование фитомелатонина (ФМТ) — быстро развивающаяся область биологии [7]. Накоплен огромный фактический материал, показывающий, что ФМТ является важной плейотропной сигнальной молекулой, которая участвует в регуляции многих физиологических процессов у растений [8–12]. ФМТ рассматривают, с одной стороны, как мощный антиоксидант, а с другой, как сигнальную

Сокращения: АБК — асбизовая кислота; БС — брассиностероиды; ГК — гибберелловая кислота; ЖК — жасмоновая кислота; ИУК — индолилуксусная кислота; НУК — нафтилуксусная кислота; СК — салициловая кислота; ЦК — цитокинины; ФГ — фитогормоны; ФМТ — фитомелатонин.

молекулу, Большинство исследователей считают, что исходная функция мелатонина была антиоксидантной, а другие функции появились позднее в ходе эволюции. Роль мелатонина как антиоксиданта рассматривается в ранее опубликованных статьях [13–17]. Данный обзор будет посвящен, главным образом, взаимодействию ФМТ и фитогормонов в регуляции физиологических процессов, а также обоснованию ранее высказанной идеи о том, что ФМТ является новым гормоном растений.

БИОСИНТЕЗ ФИТОМЕЛАТОНИНА

Предшественником мелатонина как у животных, так и у растений является триптофан [18]. Сравнение синтеза мелатонина у животных и ФМТ у растений анализируется в статье [19]. Синтез ФМТ у растений более сложный, чем синтез мелатонина у животных, и, кроме того, растения могут производить больше мелатонина, чем животные.

Путь биосинтеза ФМТ в растениях был доказан в опытах на зверобое (*Hypericum perforatum* L.) с применением ^{14}C -меченого триптофана. Метка была обнаружена в триптаmine, серотонине, индолилуксусной кислоте и ФМТ [20].

Можно выделить 4 пути биосинтеза ФМТ, в которых участвуют, по крайней мере, 6 ферментов (рис. 1):

I. Триптофан превращается в триптамин в цитоплазме с участием триптофандекарбоксилазы (TDC). Затем триптамин подвергается дальнейшему превращению в серотонин при катализе триптамин-5-гидроксилазой (T5H) в эндоплазматическом ретикулуме [10]. N-ацетилирование серотонина происходит с помощью фермента серотонин-N-ацетилтрансферазы (SNAT), который превращает серотонин в N-ацетилсеротонин в хлоропластах, а затем происходит метилирование ацетил-серотонин-метилтрансферазой (ASMT) или O-метилтрансферазой кофейной кислоты (COMT) с образованием ФМТ в цитоплазме.

II. Образование серотонина как в варианте I. Далее серотонин с участием ASMT или COMT превращается в 5-метокситриптамин в цитоплазме и затем превращается в мелатонин с помощью SNAT в хлоропластах.

III. Точно такой же путь биосинтеза как у животных, но окончательно не доказан. Триптофан превращается в 5-гидрокситриптофан с помощью триптофан-5-гидроксилазы (TPH), затем под действием триптофандекарбоксилазы (TDC) в цитоплазме превращается в серотонин. Серотонин с участием SNAT в хлоропластах превращается в N-ацетилсеротонин, который далее с помощью ASMT или COMT превращается в мелатонин.

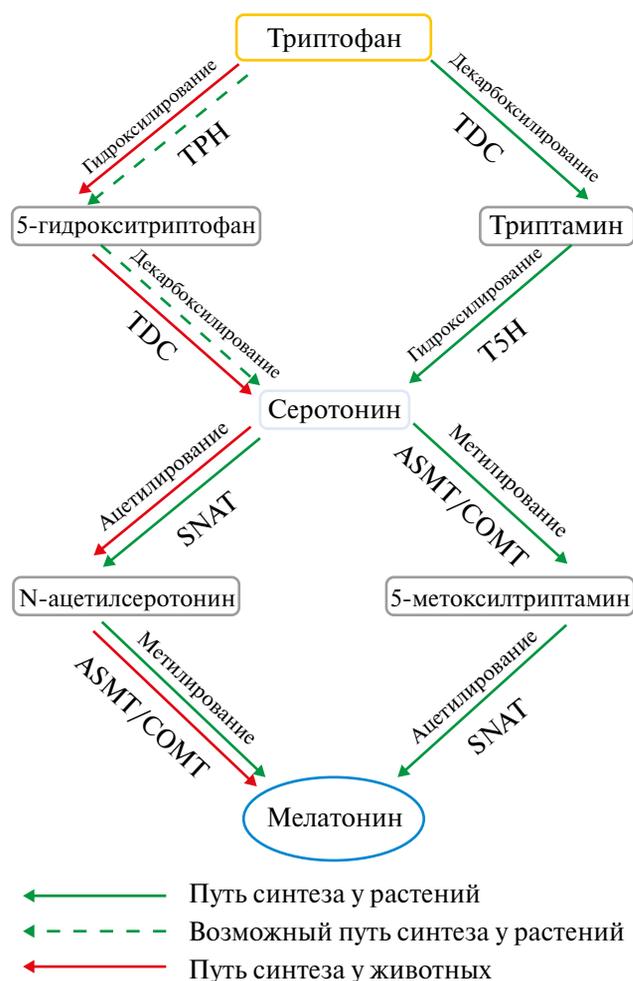


Рис. 1. Схема синтеза мелатонина у животных и фитомелатонина у растений. Синтез мелатонина у животных идет по одному стандартному пути (красные стрелки). Синтез ФМТ более сложен, доказан один путь превращения триптофана в серотонин и два пути превращения серотонина в ФМТ (зеленые стрелки). Существуют некоторые свидетельства превращения триптофана в серотонин по животному пути (зеленые пунктирные стрелки). При этом в реакциях принимают участие не менее 6 ферментов: TDC – триптофандекарбоксилаза, TPH – триптофан-5-гидроксилаза, T5H – триптамин-5-гидроксилаза, SNAT – серотонин-N-ацетилтрансфераза, ASMT – ацетилсеротонинметилтрансфераза, COMT – серотонин-O-метилтрансфераза кофейной кислоты.

IV. Серотонин, образующийся по пути III, метилируется в цитоплазме с участием ASMT или COMT, превращаясь в 5-метокситриптамин, который с участием SNAT в хлоропластах превращается в мелатонин [10].

I и II пути биосинтеза ФМТ широко распространены у растений, а возможность существования двух последних путей подтверждается немногочисленными данными. Например, 5-гидрокситриптофан (продукт первого этапа биосинтеза ФМТ по пути III и IV) обнаружен в семенах *Griffonia simplicifolia* и корнях риса

(*Oryza sativa*) [10, 21]. У растений *Hypericum perforatum* идентифицирована триптофангидроксилаза (ТРН), которая катализирует превращение триптофана в 5-гидрокситриптофан [22].

ASMT и COMT являются функционально сходными членами семейства О-метилтрансфераз [23], но они могут действовать в разных условиях. В нормальных условиях доминирующий путь включает ацетилирование серотонина с образованием N-ацетил-5-гидрокситриптамина (путь I), а затем О-метилирование с образованием мелатонина (путь II) [24, 25]. Однако при абиотическом стрессе серотонин сначала метилируется с образованием 5-метокситриптамина под действием ASMT, а затем ацетилируется, превращаясь в мелатонин (путь II) [25]. В растениях встречаются изоформы основных ферментов биосинтеза ФМТ. В рисе идентифицированы три функционально активных TDC (TDC1-TDC3) [26], две изоформы SNAT (SNAT1 и SNAT2) и три изоформы ASMT (ASMT1-ASMT3) [27]. По меньшей мере 14 изоформ ASMT (SlASMT1-14) были обнаружены в томате (*Solanum lycopersicum*), и более 50 изокодов SNAT были найдены в геноме хлопчатника (*Gossypium hirsutum*) [28]. Каждая изоформа фермента может реагировать на различные сигналы окружающей среды, что создает дополнительные возможности для регуляции содержания ФМТ.

SNAT или ASMT являются лимитирующими ферментами для биосинтеза мелатонина как у животных, так и у растений.

Использование трансгенных растений с инактивированными или сверхэкспрессированными генами ферментов биосинтеза ФМТ, показало, что активация их экспрессии способствует повышению стрессоустойчивости растений, а также влияет на процессы роста и развития [28, 29].

Экспрессия генов биосинтеза ФМТ регулируется различными стрессорами, фитогормонами, самим мелатонином и другими факторами. В последние годы получены важные данные, раскрывающие некоторые элементы молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов биосинтеза ФМТ. На растениях томатов было показано, что *транс*-фактор теплового шока HsfA1a обеспечивает толерантность к кадмию за счет взаимодействия с промотором гена *COMT1*, активации его транскрипции и накопления ФМТ [30]. У маниока (*Manihot esculenta*) MeWRKY79 и *транс*-фактор теплового шока MeHsf20 взаимодействовали с W-бокс и *цис*-элементами теплового стресса (*HSEs*) в промоторе *ASMT2* (*MeASMT2*), соответственно, вызывали накопление ФМТ и повышали устойчивость растений к инфекции *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) [31]. Два RAV *транс*-фактора маниока MeRAV1 и MeRAV2 активировали

экспрессию трех генов, кодирующих ферменты биосинтеза ФМТ (*MeTDC2*, *MeT5H* и *MeASMT1*), обеспечивая накопление ФМТ и повышая устойчивость растений к бактериальной инфекции [32]. В растениях маниока обнаружен ген, кодирующий протеинфосфатазу 1 типа 2С (MePP2C1), которая является негативным регулятором уровня ФМТ в маниоке. MePP2C1 физически взаимодействует с MeRAV1/2 и MeWRKY20 и дефосфорилирует их по остаткам серина S35, S34 и S176, тем самым препятствуя их способности активировать транскрипцию генов биосинтеза ФМТ. Важно заметить, что эта протеинфосфатаза участвует также в сигналинге АБК [33].

Тан с коллегами [4] предположили, что митохондрии и хлоропласты являются основным местом биосинтеза ФМТ в растениях. Данная идея подтверждается тем, что в этих компартментах клетки самый высокий уровень ФМТ [12]. Кроме того, очищенные хлоропласты, к которым добавляли субстрат для синтеза фитомелатонина, вырабатывали в 2 раза больше ФМТ, чем контрольные хлоропласты [34]. Подобно митохондриям животных, митохондрии растений также являются важным местом для синтеза ФМТ [35]. Показано, что в нормальных условиях роста растения преимущественно осуществляют биосинтез ФМТ в хлоропластах. Когда хлоропластный путь по какой-либо причине блокируется, биосинтез ФМТ происходит в митохондриях [24].

Вполне очевидны преимущества биосинтеза ФМТ в хлоропластах и митохондриях. Во-первых, ацетил-КоА синтезируется и присутствует на высоком уровне в обеих органеллах, а он является кофактором биосинтеза ФМТ. С точки зрения доступности субстрата, биосинтез ФМТ в хлоропластах и митохондриях более эффективен, чем его биосинтез в других областях клетки. Во-вторых, основные источники активных форм кислорода (АФК) находятся в этих двух органеллах, и эти органеллы сталкиваются с более сильным окислительным стрессом, чем другие клеточные структуры, поэтому локально синтезированный ФМТ может оказывать защитное действие, прежде всего, в хлоропластах и митохондриях.

МЕТАБОЛИЗМ ФИТОМЕЛАТОНИНА

Первый метаболит ФМТ, обнаруженный в растениях, N-ацетил-N-формил-5-метоксикинурамин (АФМК) действует как скавенджер свободных радикалов и повышает устойчивость водного гиацинта к воздействию тяжелых металлов [36].

АФМК генерируется многочисленными ферментативными, неферментативными реакциями, свободными радикалами и другими окис-

лителями [37]. Среди ферментов, способных продуцировать АФМК из мелатонина в рисе была идентифицирована 2,3-диоксигеназа индоламина (IDO) [38]. Кроме того, в растениях были идентифицированы гидроксированные формы мелатонина, такие как 2-, 4- и 6-гидрокси-мелатонин. Уровни 4- и 6-гидрокси-мелатонина в растениях низкие, однако содержание 2-гидрокси-мелатонина в рисе превышало содержание ФМТ примерно в 400 раз [39]. Позднее был идентифицирован фермент 2-гидроксилаза (М2Н), участвующий в синтезе 2-гидрокси-мелатонина [39]. В растениях был идентифицирован еще один метаболит ФМТ, циклический 3-гидрокси-мелатонин (сЗОНМ), вырабатываемый ферментом мелатонин-3-гидроксилазой [24].

2- и 3-гидрокси-мелатонин значительно повышают устойчивость растений к разным абиотическим стрессам как за счет прямой антиоксидантной функции, так и за счет усиления синтеза антиоксидантных ферментов [40] и модуляции экспрессии генов.

Различные уровни ФМТ и его метаболитов могут привести к различным физиологическим эффектам, когда ФМТ либо применяется экзогенно, либо избыточно вырабатывается путем эктопической сверхэкспрессии. В связи с этим, помимо ФМТ необходимо изучать роль и механизм действия его предшественников и метаболитов в повышении устойчивости растений к стрессу.

РЕЦЕПТОР ФИТОМЕЛАТОНИНА

Важнейшим этапом на пути признания ФМТ в качестве нового фитогормона является открытие его рецептора. Первый рецептор фитомелатонина PMTR1/CAND2 (Phytomelatonin receptor 1/Candidate G-protein coupled receptor 2) был идентифицирован в *A. thaliana* в 2018 г [41]. Его молекулярная масса равна 34.1 кДа, он имеет 7 трансмембранных доменов и относится к рецепторам GPCRs типа (G protein-coupled receptor). Есть некоторое сходство этого белка по аминокислотным последовательностям с животными рецепторами мелатонина MT1/MT2 [41]. AtPMTR1 — взаимодействует с GPA1 (альфа-субъединица гетеротримерных G-белков), вызывая опосредованное NADPH-оксидазой образование H_2O_2 , усиливая приток Ca^{2+} и стимулируя отток K^+ , что приводит к закрытию устьиц. AtPMTR1 является белком плазматической мембраны, который демонстрирует специфическое и насыщенное связывание с ФМТ. Мутантная линия *A. thaliana* с инактивированным геном *AtCAND2*, нечувствительна к индуцированному ФМТ закрыванию устьиц. Кроме того, у этой линии ФМТ не индуцирует образование H_2O_2 и поток Ca^{2+} . Авторы сделали заклю-

чение, что ФМТ регулирует закрытие устьиц через CAND2/PMTR1-опосредованный каскад передачи сигналов H_2O_2 и Ca^{2+} .

Однако позднее было высказано сомнение по поводу рецепторной функции AtPMTR1 [42]. Возражения касались внутриклеточной локализации AtPMTR1, индукции ФМТ активности MAPK (MPK3/6) и экспрессии нескольких генов у *cand2* мутантов, а также активации MPK3/6 у мутанта *gpa1*. Критическое отношение к первому предполагаемому рецептору ФМТ активировало работы по его изучению. За прошедшие годы получено много новой информации о предполагаемом рецепторе ФМТ. К настоящему времени в разных видах растений идентифицировано, по крайней мере, несколько белков гомологов AtPMTR1, участвующих в регуляции различных ФМТ-зависимых физиологических процессов [43].

В частности, установлено, что PMTR1 регулирует прорастание семян и рост проростков *A. thaliana* путем регулирования гомеостаза АБК [44]. Показано, что MePMTR1 необходим для задержки ФМТ старения листьев маниока в темноте. Кроме того, MePP2C, белок-фосфатаза, негативно регулирует сигналинг ФМТ, взаимодействуя с *транс*-факторами, связанными с метаболизмом ФМТ MeRAV1/2 и MeWRKY20 и рецептором MePMTR1 [33]. Регуляция ФМТ закрытия устьиц, АФК и СК-сигналинга, а также экспрессии генов устойчивости табака к *Phytophthora* зависела от гомологов рецептора trP47363 и trP13076 [45]. Оказалось, что ZmPMTR1 необходим для устойчивости растений кукурузы к засухе [46]. Вполне возможно, что в ответ на засоление ФМТ регулирует нижележащие сигнальные каскады через сигнальные пути PMTR1-MAPK, что активирует экспрессию генов, реагирующих на солевой стресс [43]. Показано, что в регуляцию повышения устойчивости ФМТ к осмотическому стрессу вовлекается рецептор PMTR1 [46]. Мы показали, что в условиях фотоокислительного стресса экзогенный ФМТ способствовал поддержанию экспрессии генов митохондриального генома и активации экспрессии генов органелльных РНК-полимераз ядерного кодирования *RPO7m* и *RPO7mp*, действуя через рецептор CAND2 [47]. В другой работе, выполненной на растениях *A. thaliana*, в том числе и на мутантах по генам сигналинга ФМТ, нами показано, что при сильном световом стрессе ФМТ может действовать как гормоноподобная молекула через сигнальный путь, опосредованный CAND2/PMTR1 [48]. Большинство доказательств участия PMTR1 в регуляции физиологических процессов основано на использовании нокаут- и сверхэкспрессирующих мутантов по *PMTR1* гену.

По нашему мнению, стоит особо отметить две недавние статьи, в которых не только проанализированы результаты последних лет по изучению рецептора ФМТ, но и высказаны некоторые идеи [43, 49] по поводу сделанных ранее критических замечаний в адрес предполагаемого рецептора ФМТ AtPMTR1 [42].

В частности, сейчас доказана локализация CAND2/PMTR1 в плазматической мембране люцерны [50, 51]. Вопрос по поводу использованных мутантов *cand2-1* и *cand2-2* не решен и требует дополнительных экспериментов [49]. Нормальная функция ФМТ у мутанта *gpa1*, у которого инактивирован ген α -субъединицы гетеротримерных G-белков, казалась бессмысленной, что ставило под сомнение рецепторную функцию CAND2/PMTR1 [42]. Однако мелатонин-индуцированная активация МРК3/6 была нарушена у мутанта *pmtr1*, но не у мутанта *gpa1-4*, что по мнению Park [49], указывает на возможное участие другого сигнального пути, не зависящего от GPA1. Имеющиеся данные позволили Park [49] заключить, что CAND2/PMTR1 является настоящим рецептором ФМТ, но им высказано пожелание в необходимости изучения связывающих свойств CAND2/PMTR1 с лигандом, используя эксперименты по вытеснению меченым фитомелатонином меченого ФМТ из лиганд-рецепторного комплекса, и с этим нельзя не согласиться.

ФИТОМЕЛАТОНИН – СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ФИТОГОРМОНАМИ

Фитогормоны (ФГ) регулируют все этапы онтогенеза растения. Причем каждый физиологический процесс регулируется не одним, а несколькими фитогормонами, поэтому правильнее сказать, что ответ растения на любое воздействие зависит не от уровня одного ФГ, а от их баланса. Эта идея была убедительно продемонстрирована более полувека назад в классической работе проф. Скуга на примере регенерации растения из каллуса табака в зависимости от соотношения содержания ауксина и цитокинина [52]. Имеющиеся данные показывают, насколько важно проанализировать характер взаимодействия ФМТ с другими фитогормонами в регуляции различных физиологических процессов. Первые исследования были сосредоточены на взаимодействии ФМТ с ауксином [53, 54], однако позднее стали изучать взаимодействия ФМТ с другими растительными гормонами [9, 23, 55–61].

Фитомелатонин и ауксины

Структурное сходство между индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) и ФМТ, наличие общего предшественника, общий первый этап пути

биосинтеза, а также активация роста растений позволили на начальном этапе исследования высказать гипотезу, согласно которой ФМТ и ИУК функционально идентичны и, более того, имеют сходный механизм действия. За последующие годы ситуация изменилась, и сейчас считается, что ФМТ и ИУК могут быть сопоставимы в функциональной активности, но, исходя из значительных структурных различий, механизмы их действия отличаются.

Ауксины и ФМТ участвуют в регуляции роста, укоренения и геотропизма растений. Наибольшее количество работ посвящено сравнительному изучению механизмов действия ФМТ и ИУК на рост растений. Оба фактора регулируют вегетативный рост, но, вероятно, используют для этого различные механизмы [62]. Влияние ФМТ на рост зависит от вида растения, концентрации ФМТ и изучаемого органа. ФМТ и ИУК подавляют рост при высоких концентрациях. Высокий уровень ФМТ блокирует выработку ИУК [63], в то время как низкие концентрации активируют [64]. Интересно, что для регуляции физиологических процессов, например, чтобы активировать рост корней *A. thaliana*, обычно требуются более высокие концентрации ФМТ в сравнении с ИУК. Наибольшая активация роста coleoptилей достигается с помощью ИУК (100%). Стимуляция роста coleoptилей ФМТ составляла 10% для овса, 20% для пшеницы, 32% для канареечника и 55% для ячменя, что расценивается как существенный ауксиноподобный эффект. Рост корней канареечника и пшеницы под действием ФМТ составлял от 56 до 86% в сравнении с действием ИУК [65]. ФМТ способствует образованию боковых и придаточных корней у многих видов растений, практически не оказывая влияния или даже ингибируя рост главного корня [62]. При этом ФМТ определяет количество и длину придаточных и боковых корней, однако не влияет на плотность корневых волосков. На основании полученных данных ФМТ стал рассматриваться в качестве растительного регулятора образования придаточных корней.

Для сравнения механизмов действия ФМТ и ИУК широко применяется транскриптомный анализ. Было показано, что ФМТ регулирует экспрессию генов сигнальных элементов ауксинов, включая TIR1 (рецептор ауксина), Aux/IAA (ключевой регулятор экспрессии генов ауксина) и SAUR (малая ауксин-индуцируемая РНК), что приводило к активации процессов роста [66, 67]. Было также установлено, что в растениях риса, обработанных ФМТ, активировались гены, связанные с ауксином. Причем ряд генов *транс*-факторов, вовлеченных в регуляцию роста и развития корней, а также в процессы, связанные с ауксином, как активировались, так и подавлялись ФМТ, что позволяло предпола-

гать вовлеченность ауксина в регуляцию роста корней ФМТ. В концентрации 600 мкМ ФМТ снижал уровень транскрипов генов биосинтеза и путей транспорта ауксина, о чем свидетельствует падение экспрессии генов *YUC1*, *YUC2*, *YUC5*, *YUC6*, *TAA1*, *TAR2*, *PIN1*, *PIN3* и *PIN7* [56]. Однако на *A. thaliana* были получены совсем другие результаты: гены ИУК-сигналинга практически не регулировались и даже подавлялись ФМТ, а гены сигналинга этилена, АБК, ЖК, СК активировались [68, 69]. Такое принципиальное различие результатов можно объяснить видоспецифичностью и тканеспецифичностью, а также изменением экспрессии генов в ходе развития растения.

Важно отметить, что в присутствии ингибиторов биосинтеза ауксина или ингибиторов полярного транспорта ауксина, ФМТ оказывал минимальное влияние на регуляцию роста корней *A. thaliana*, что позволило допустить ауксин-зависимую регуляцию роста корней фитомелатонином [70]. Однако другие авторы, работая с мутантами по генам синтеза и сигналинга ИУК, обнаружили, что увеличение ветвления корней, наблюдаемое для этих растений, не зависело от действия ауксина, предполагая, что существует альтернативный механизм [69].

Показана способность ФМТ стимулировать укоренение саженцев яблони. При этом активировались ген *транс*-фактора, участвующего в развитии корней (*WOX11*), гены биосинтеза ИУК (*YUCCA2/10*), гены транспорта ИУК (*PIN1/3*, *AUX1*) и сигнальные факторы ИУК (*ARF7/19*, *IAA5*). Повышение уровня ИУК и активация элементов сигналинга под действием ФМТ, вероятно, улучшают образование придаточных корней [71].

Из вышеприведенного краткого анализа литературных данных можно видеть, сколь сложно взаимодействие между ФМТ и ИУК и понятно, что, несмотря на ряд превосходных работ, пока нельзя сделать определенный вывод о характере взаимодействия этих двух факторов при регуляции роста растений.

Однако важно знать, как ФМТ и ИУК взаимодействуют в регуляции других процессов. Очень серьезным доводом в пользу ауксин-независимого пути действия ФМТ являются следующие данные.

Маркерная линия *DR5::GFP*, реагирующая на ауксин, была использована для сравнения влияния ФМТ и ауксина (нафтилуксусная кислота, НУК) на экспрессию данной конструкции в первичных кончиках корней *A. thaliana* [72]. *DR5* (Direct Repeat 5) – это синтетический промотор, содержащий элементы, реагирующие на ауксин (*AuxREs*). Обработка растений 0.1 мкМ НУК значительно активировала экспрессию данной конструкции, однако ФМТ в концентрациях 0.1,

5 и 50 мкМ не влиял на экспрессию *GFP* гена. Кроме того, НУК в условиях усиленной индукции экспрессии альтернативной оксидазы антимицином А в составе конструкции *AOX1a::LUC*, значительно подавляла свечение LUC, в то время как ФМТ (5–200 мкМ) не оказывал влияния. Таким образом, ФМТ не использует в регуляции экспрессии генов специфичные для ауксинов регуляторные элементы (*AuxREs*) и не подавляет индукцию *AOX1a*, что указывает на значительные различия в механизмах действия ФМТ и ауксинов. Это позволило предположить, что ФМТ модулирует развитие боковых корней через ИУК-независимые пути.

Установлены антагонистические взаимоотношения между ФМТ и ИУК на уровне транскрипции с привлечением *транс*-фактора *ZAT6 A. thaliana*. Экзогенный ФМТ активировал экспрессию гена *ZAT6*, в то время как ауксин оказывал противоположный эффект. Инактивация гена *ZAT6* снижала эффект ФМТ на синтез ауксина. Кроме того, показано, что с *ZAT6* взаимодействует еще с двумя белковыми факторами – Indeterminate domain 15 (*IDD15*) и Indole-3-acetic acid 17 (*IAA17*), что доказывает участие *ZAT6* в сигналинге ауксина [73].

Антагонистические отношения между ФМТ и ИУК наблюдались при регуляции старения листьев *A. thaliana*. ФМТ подавлял экспрессию гена *Auxin resistant 3 (AXR3)/Indole-3-acetic acid inducible 17 (IAA17)*, являющегося положительным фактором естественного старения листьев, и задерживал процесс старения [74].

Высокая концентрация ФМТ снижала содержание ИУК. Показано, что в трансгенных растениях томатов сверхэкспрессия генов биосинтеза фитомелатонина *SNAT* и *HIOMT* (гидроксииндол-О-метилтрансфераза) привела к резкому снижению уровня ИУК и ослаблению апикального доминирования. Это объясняется не антагонизмом между ФМТ и ИУК, а следствием чрезмерного потребления триптофана при синтезе фитомелатонина, общего предшественника ФМТ и ИУК. Авторы заключили, что ФМТ не заменяет ИУК при апикальном доминировании [63].

Совершенно разный характер взаимодействия ФМТ и ИУК наблюдается в условиях стрессов. При избытке фтора ФМТ в проростках риса снижал содержание ИУК, изменял гомеостаз фитогормонов и препятствовал поглощению фтора растениями [75]. В другом исследовании, наоборот, токсичность бора в шпинате (*Spinacia oleracea*) уменьшалась за счет увеличения концентрации ИУК фитомелатонином [76]. В условиях засухи значительно снижался уровень ИУК в листьях кукурузы, особенно на ранних стадиях роста, однако экзогенный ФМТ повышал содержание ИУК на 31–35%, что, как думают авторы,

способствовало росту и урожайности в условиях засухи [77]. Снижение уровня ИУК под действием засоления может быть связано с ингибированием биосинтеза ИУК и/или увеличением ее деградации или превращением в неактивную форму. ФМТ увеличивал содержание ИУК при солевом стрессе в этиолированных проростках *Brassica juncea* [64].

Таким образом, мы кратко проанализировали взаимодействие между ФМТ и ауксином в регуляции роста и развития растений, а также в условиях действия неблагоприятных факторов. Как нам кажется, чем ближе структурно и функционально изучаемые регуляторы, тем сложнее выявить специфические особенности каждого из них.

Фитомелатонин и абсцизовая кислота

Абсцизовая кислота (АБК) играет важную роль в физиологических процессах и в реакции устойчивости растений к абиотическим стрессам. Большинство негативных факторов окружающей среды, включая засоление, засуху, осмотический стресс, пониженные положительные температуры и др., вызывают повышение содержания АБК в тканях.

Наверное, не будет преувеличением сказать, что АБК играет важнейшую роль при стрессе любой природы, поэтому рассмотрение взаимодействия между ФМТ и АБК представляет значительный интерес. Это взаимодействие сложное и зависит от стрессовых условий, вида растения и применяемой концентрации ФМТ. Интересные данные о влиянии разных концентраций ФМТ на содержание, метаболизм и сигналинг АБК приведены в статье Wang с соавт. [56], однако они касаются разных видов растений, разных изучаемых физиологических процессов, поэтому какие-либо общие выводы на их основании сделать проблематично. В большинстве случаев при засухе и засолении ФМТ подавляет накопление АБК, а при действии пониженной температуры чаще активирует синтез АБК, хотя в каждом случае могут быть исключения.

В условиях солевого стресса в прорастающих семенах огурца подавляется катаболизм АБК и биосинтез ГК, что приводит к накоплению АБК и к задержке прорастания семян, ухудшению образования боковых корней и роста проростков. Экзогенный ФМТ повышал экспрессию генов катаболизма АБК (монооксигеназы, *CYP707A1* и *CYP707A2*) и генов биосинтеза ГК (*GA20ox* и *GA3ox*), одновременно подавлял активность гена биосинтеза АБК (9-цис-эпокси-каротиноиддиоксигеназы, *NCED2*), что привело к снижению уровня АБК, повышению содержания ГК₃ и ГК₄ и активировало процесс прорастания семян [78]. Подобная же ситуация наблюдалась при прорастании семян хлопчат-

ника (*Gossypium hirsutum* L.) в условиях солевого стресса [79]. ФМТ снижал содержание АБК ранее описанным способом и подавлял экспрессию гена специфичного для семян *транс*-фактора *GhDPBF2*. Одновременно ФМТ увеличивал содержание ГК, что снизило повреждение семян при солевом стрессе и способствовало их успешному прорастанию.

В ряде случаев ФМТ изменял баланс эндогенных фитогормонов, и это могло иметь решающее значение для реакции растений на стрессовые условия. В условиях засухи ФМТ значительно изменил соотношение эндогенных фитогормонов в листьях кукурузы. Было снижено содержание АБК, но увеличен уровень ГК₃, ИУК и *транс*-зеатинрибозид. Такие изменения привели к увеличению содержания фотосинтетических пигментов, улучшению ультраструктуры клеток листа и к лучшему развитию растений [80]. Еще более сложная картина наблюдалась при задержке ФМТ старения листьев плевела многолетнего (*Lolium perenne* L.), вызванного повышенной температурой. Экзогенный ФМТ увеличивал содержание эндогенного ФМТ и ЦК (изопентениладенина и *транс*-зеатинрибозид), но снижал содержание АБК, подавляя экспрессию двух генов биосинтеза (*LpZEP* и *LpNCED1*) и двух генов ключевых *транс*-факторов сигналинга АБК (*LpABI3* и *LpABI5*). ФМТ активировал гены синтеза ЦК (*LpIPT2* и *LpOG1*), гены ответа на ЦК *ARR* В-типа (*LpARR1* и *LpARR10*), но подавлял *ARR* гены А-типа (*LpARR5* и *LpARR17*). Таким образом, подавление старения экзогенным ФМТ может быть связано с активизацией синтеза и сигналинга ЦК при ингибировании синтеза и сигналинга АБК [81].

ФМТ и АБК играют обычно противоположную роль в регуляции старения листьев. Во время старения листьев китайской цветной капусты ФМТ тормозил накопление эндогенной АБК, подавляя экспрессию генов ее биосинтеза (*BrNCED3*, *BrABA2*, *BrAAO3*). Кроме того, ФМТ подавлял экспрессию генов *транс*-факторов АБК (*BrABF1*, *BrABF4*, *BrABI5*), которые активируют гены катаболизма хлорофилла, прямо взаимодействуя с промоторами этих генов, тем самым задерживая убыль хлорофилла. Задержка старения усиливалась способностью экзогенного ФМТ поддерживать более высокие уровни ФМТ в отделенных листьях [82].

Обработка ФМТ значительно повышала толерантность как устойчивой (*Malus prunifolia*), так и чувствительной (*M. hupehensis*) к засухе яблони. По мнению авторов, ФМТ обеспечивал устойчивость к засухе двумя путями: 1 – усиливал деградацию АБК и подавлял ее синтез; 2 – ФМТ непосредственно поглощал H₂O₂ и активировал антиоксидантные ферменты. Умень-

шение содержания АБК и H_2O_2 действовало синергически и приводило к повышению активности функционирования устьиц в условиях засухи [83].

Как мы отмечали, ФМТ в каких-то особых условиях может повышать уровень АБК, например, у пырейника (*Elymus nutans*) при воздействии низкой температуры. При этом экзогенная АБК или ингибиторы синтеза АБК не влияли на уровень эндогенного ФМТ, что позволило предположить, что ФМТ может действовать выше АБК при регуляции ответа растений на низкотемпературный стресс. Это также может означать, что ФМТ в ответ на пониженную температуру может действовать как АБК-зависимым, так и АБК-независимым путем [84, 85]. При этом экзогенный ФМТ повышал уровень АБК при воздействии холодового стресса в растениях ячменя, предварительно прошедших обработку засухой. Экзогенный ФМТ увеличивал содержание эндогенного ФМТ, и это накопление не зависело от АБК. Совместно ФМТ и АБК поддерживали оптимальный водный статус и снижали негативный эффект окислительного стресса.

Неожиданные результаты получены на проростках огурца. При охлаждении в них резко возрастало содержание АБК, а экзогенный ФМТ увеличивал ее еще больше, однако через несколько дней наблюдалось падение АБК. С первых дней эксперимента повышалась экспрессия гена *CsZat12*, участвующего в биосинтезе путресцина. Установлена прямая корреляция между путресцином и АБК. Вполне возможно, что ФМТ ослаблял действие холода на проростки огурца путем повышения экспрессии гена *CsZat12* и модуляции метаболизма полиаминов и АБК [86].

Взаимодействие ФМТ и АБК происходит и при биотическом стрессе. Чтобы обеспечить устойчивость к патогенам, зараженные растения запускают экспрессию генов защиты, синтезируют АБК и регулируют апертуру устьиц. ФМТ, регулируя синтез АБК и иницируя сигналы АБК, активно препятствует проникновению патогенов через устьица. Поскольку ФМТ обеспечивает зависимое от рецептора закрытие устьиц [41], то, возможно, что ФМТ напрямую регулирует устьичный иммунитет через АБК-независимый механизм [87].

Не только ФМТ влияет на АБК, но и АБК, в свою очередь, может влиять на биосинтез ФМТ. Было показано, что три гена риса, кодирующие разные изоформы ASMT (ASMT1, ASMT2, ASMT3), были активированы АБК и МЖ, что говорит о взаимосвязи этих трех фитогормонов [88].

В поисках причины вариабельности уровня ФМТ в маниоке Bai с коллегами [33] идентифицировали ген, отвечающий за уровень ФМТ в маниоке и, как оказалось, этот ген ко-

дирует протеинфосфатазу MePP2C1, которая служит негативным регулятором естественной вариации уровня ФМТ. Эта фосфатаза подавляет синтез ФМТ, дефосфорилируя отдельные аминокислоты в *транс*-факторах (MeRAV1/2 и MeWRKY20), участвующих в транскрипции генов биосинтезе ФМТ и, кроме того, она является важнейшим компонентом сигнальной цепи АБК. Таким образом, MePP2C1 может играть значительную роль во взаимодействии ФМТ и АБК в регуляции физиологических процессов у растений [33].

Важно отметить, что ФМТ и АБК по-разному регулируют закрытие устьиц [89]. ФМТ способен к закрытию устьиц в узком диапазоне концентраций, а АБК регулирует динамику работы устьиц в широком пределе концентраций. АБК способен индуцировать закрытие устьиц и ингибировать открытие закрытых устьиц под действием света, тогда как ФМТ может способствовать только закрытию открытых устьиц. Интересно, что, устьица мутантов по рецептору ФМТ *pmtr1* всегда остаются открытыми, но АБК может их закрыть. Это означает, что АБК и ФМТ имеют различные механизмы динамики закрытия устьиц.

Таким образом, из приведенных данных можно видеть, как сложно и разнообразно взаимодействие ФМТ и АБК в регуляции стресс устойчивости растений. Дальнейшее изучение сигнальных сетей ФМТ и АБК откроет многие неизвестные в настоящее время пути взаимодействия этих двух важных фитогормонов.

Фитомелатонин и цитокинины

Цитокинины (ЦК) участвуют в регуляции почти всех этапов роста и развития растений, включая клеточное деление, развитие побега, световую регуляцию, старение.

Одной из отличительных особенностей действия ЦК является задержка старения листьев. На этом свойстве ранее существовал биотест для обнаружения цитокининовой активности у новых физиологически-активных соединений. В 2009 г. Arnao и Hernández-Ruiz [90] показали, что ФМТ в концентрации от 0.1 до 1 мМ задерживал старение отделенных от растения листьев ячменя, иницированное темнотой. О задержке старения судили по убыли хлорофилла. Кинетин также задерживал деградацию хлорофилла, но его эффект был слабее, чем у ФМТ. Возможно, что более сильный эффект ФМТ был связан с его мощной антиоксидантной активностью. В данной работе характер взаимодействия ЦК и ФМТ не был установлен. Позднее задержка старения ФМТ была показана для яблони, огурца, риса, персика, райграсса, маниока и *Arabidopsis* [55].

Значительный успех в понимании взаимодействия ЦК и ФМТ был достигнут при изучении задержки старения листьев полевицы полз-

учей (*Agrostis stolonifera*), которое было вызвано засухой [91]. В трансгенных растениях, несущих ген изопентенилтрансферазы (*IPT*), и в растениях дикого типа экзогенный ФМТ (20 мкМ) увеличивал уровни транскриптов генов *TDC1*, *SNAT1* и *COMT*, что привело к увеличению содержания эндогенного ФМТ. Фитомелатонин и/или ЦК значительно подавляли уровни транскриптов генов и активность ферментов деградации хлорофилла во время засухи у обработанных ФМТ растений. Авторы показали, что экзогенный ФМТ также повышал уровни транскриптов генов сигналинга ЦК при сверхэкспрессии гена *IPT*, включая гистидиновые киназы (*HK3* и *HK4*), гистидинфосфотрансферазы (*HP1* и *HP4*), регуляторы ответа типа А (*RR4* и *RR9*) и типа В (*RR2* и *RR10*), что указывает на участие ЦК-сигналинга в устойчивости растений к засухе. Следовательно, совместное влияние повышенного содержания эндогенного ФМТ, активация экспрессии генов биосинтеза ФМТ и генов ЦК-сигналинга могут, вероятно, приводить к повышению засухоустойчивости полевицы ползучей.

Сходные результаты были получены при изучении роли ФМТ в задержке старения листьев в условиях повышенной температурой у плевела многолетнего [81]. Экзогенный ФМТ увеличивал эндогенное содержание мелатонина и ЦК (изопентениладенина и *транс*-зеатинрибозид). При этом ФМТ значительно повышал экспрессию генов биосинтеза ЦК *LpIPT2* и *LpLOG1*. Кроме того, ФМТ увеличивал уровень транскриптов *ARR*-генов В-типа (*LpARR1* и *LpARR10*), которые были подавлены при тепловом стрессе. Напротив, тепловой стресс значительно увеличил экспрессию генов *ARR* А-типа (*LpARR5* и *LpARR17*), а ФМТ их ингибировал. В то же самое время ФМТ уменьшал содержание АБК и экспрессию двух генов биосинтеза АВА (*LpZEP* и *LpNCED1*), а также двух генов ключевых *транс*-факторов АБК сигналинга (*LpABI3* и *LpABI5*). В результате можно заключить, что защитный эффект ФМТ мог быть достигнут активацией генов синтеза и сигналинга ЦК и подавлением экспрессии соответствующих генов АБК.

В нашей работе было показано, что ФМТ ослабляет негативное действие высокой освещенности на растения *A. thaliana* [92]. ФМТ восстанавливал экспрессию генов синтеза цитокинина *IPT3*, *IPT5* и *LOG7*, а также генов трансдукции сигнала ЦК *ANK2,3* и *ARR 1, 4, 5* и *12*, которая была снижена при стрессе. В мутантах по генам сигналинга ЦК ФМТ не оказывал позитивного влияния в условиях светового стресса. Кроме того, ЦК увеличивал экспрессию гена синтеза мелатонина *ASMT* в растениях дикого типа. В мутанте с повышенной чувствительностью к ЦК (*ipt3, 5, 7*) была активирована экспрессия генов синтеза ФМТ (*ASMT*, *SNAT*, *COMT*), а так-

же предполагаемых сигнальных генов *CAND2* и *GPA1*. Это позволяет предположить, что ФМТ действует совместно с ЦК в преодолении негативного эффекта светового стресса.

Очень интересные результаты были представлены в статье Sliwiak с соавт. [93], где показана способность ФМТ и ЦК (*транс*-зеатина) связываться с LIPR-10.2В белком, имеющим отношение к патогенезу (PR-10). Этот белок выделен из желтого люпина (*Lupinus luteus*). Показано, что данный белок является низкоаффинным МТ-связывающим белком. Какую роль он может играть в механизме взаимодействия ЦК и ФМТ, пока неизвестно.

Таким образом, можно заключить, что ФМТ и ЦК взаимодействуют как на уровне синтеза, так и сигналинга в ходе регуляции физиологических процессов у растений.

Фитомелатонин и brassinosterоиды

Brassinosterоиды – фитогормоны широкого спектра действия. Они стимулируют прорастание семян, усиливают деление и растяжение клеток, влияют на время цветения, фотоморфогенез, способствуют повышению устойчивости растений к стрессам.

Холод и засуха приводят к быстрому увеличению содержания мелатонина и БС в листьях плевела многолетнего (*Lolium perenne* L.). Экзогенный ФМТ повышал уровень эндогенного БС и ФМТ и вызывал резкое изменение экспрессии генов при засухе и холодовом стрессе [94]. Более 37 генов, связанных с биосинтезом (*CYP750A1*, *CYP707A5*, *CYP707A7*, *CYP87A3* и *CYP90D2*), ответом на стресс и сигналингом БС (*SERK1* и *IWS1*) были индуцированы ФМТ. Полученные результаты позволяют предположить, что мелатонин и БС функционируют совместно в ответ на холод и засуху, при котором ФМТ индуцирует накопление БС и последующую активацию широкого спектра стресс-регулируемых генов.

Активация генов биосинтеза БС фитомелатонином показана с помощью транскриптомного анализа растений рапса [66] в условиях засоления, что привело к накоплению БС и повышению устойчивости растений к стрессу.

Очень интересные результаты, касающиеся скотоморфогенеза и взаимодействия ФМТ и БС, получены корейскими учеными [95]. Мутантный рис с подавленным геном *SNAT2* имел карликовый фенотип с прямостоячими листьями, напоминающими brassinosterоид-дефицитные мутанты, и развивался по фотоморфогенному типу в ночное время без зависимой от темноты задержки роста. Низкий уровень БС в линиях *SNAT2 RNAi* шел параллельно с пониженной экспрессией мРНК *DWARF4* и гена рецептора БС *BRI1*. Экзогенный ФМТ индуцировал несколько биосинтетических генов БС, включая

DWARF4, *D11* и *RAV1*, а также ген рецептора БС *BR11*. *BZR1* (*BRASSINAZOLE RESISTANT1*), позитивный регулятор сигналинга brassино-стероидов и одновременно отрицательный *транс*-фактор биосинтеза БС, были подавлены после воздействия ФМТ. Авторы заключили, что ФМТ является положительным регулятором скотоморфогенеза за счет регуляции биосинтеза БС в растениях. В мутанте, где мало ФМТ, развивался фотоморфогенный фенотип, однако ФМТ увеличивал содержание БС и способствовал скотоморфогенезу.

Растения риса с подавленным геном *SNAT2*, имевшие карликовый фенотип и сниженный уровень ФМТ и БС, показали повышенную устойчивость к различным стрессовым воздействиям, включая кадмий, соль, холод и жару [96]. Другие мелатонин-дефицитные мутантные линии риса с подавленным синтезом БС (например, *comt* и *t5h*) также проявляли устойчивость к солевому и тепловому стрессу, в то время как проростки риса, дефицитные по ФМТ, без снижения уровня БС (т.е. *tdc*) не проявили повышенной устойчивости к стрессу. Это позволяет предположить, что стрессоустойчивость повышалась не за счет дефицита ФМТ, а за счет того, что недостаток ФМТ, вызывал снижение уровня БС.

В другой работе показано, что ФМТ в высокой концентрации (100–1000 мкМ) ингибировал удлинение гипокотыля *A. thaliana* [97]. Используя мутанты по генам синтеза и сигналинга БС, авторы предположили, что ФМТ снижает содержание эндогенного БС через репрессию его биосинтеза, что приводит к инактивации БС-сигналинга и снижению транскрипционной активности *BZR1/BES1*, а затем к снижению экспрессии БС-индуцируемых генов (*PRE1*, *IAA19*, *EXPA8* и *SAURs*), вовлеченных в удлинение клеток гипокотыля, и повышению экспрессии БС-биосинтетических генов (*DAWF4*, *CPD*, *CYP90D1* и *BR6OX2*) посредством отрицательной обратной связи.

В целом, можно заключить, что наблюдается тесное взаимодействие между ФМТ и БС, направленное не только на повышение устойчивости растений к неблагоприятным условиям произрастания, но и на регуляцию таких важных процессов развития растений, как, например, скотоморфогенез.

Фитомелатонин и гиббереллины

Гиббереллины – большая группа фитогормонов дитерпеновой природы, которые выполняют в растениях разнообразные функции, связанные с контролем удлинения гипокотыля, прорастания семян, зацветания, скотоморфогенеза и т. д.

Взаимодействие ФМТ и ГК до сих пор более тщательно изучали только в процессах прораста-

ния семян и цветения, поэтому кратко остановимся на этих вопросах.

Прорастание семян является важнейшим этапом онтогенеза растения, в ходе которого ГК и АБК действуют как гормоны-антагонисты, а ФМТ может изменить соотношение ГК/АБК в пользу, например, гиббереллинов за счет активации экспрессии генов синтеза ГК и подавления генов синтеза АБК. Действительно, было показано, что ФМТ может снижать уровень АБК во время прорастания семян огурца в условиях солевого стресса, вызывая активацию генов ферментов катаболизма АБК и снижая уровень экспрессии генов биосинтеза АБК [78]. С другой стороны, ФМТ активировал экспрессию генов биосинтеза ГК (*GA20ox* и *GA3ox*) и увеличивал содержание ГК₄, способствуя прорастанию [78]. При солевом стрессе у *Brassica napus* L ФМТ стимулирует рост проростков за счет повышения уровня ГК, регулируя три основных фермента биосинтеза ГК (*GA20ox*, *GA3ox*, *GA2ox*) и гены, кодирующие рецептор ГК – *GID1* [66].

Интересно, что в проростках томатов ФМТ ингибировал экспрессию гена *GAI*, кодирующего белок DELLA, а также генов ГК-катаболизма (*GA2ox1*, *GA2ox2*), что говорит о прямой корреляции взаимодействия ГК и ФМТ в данной системе [98]. При обработке ФМТ скорость прорастания семян *A. thaliana* мутанта *gai-3* по биосинтезу ГК и нечувствительного к ГК мутанта *gai-1* была ниже, чем у растений дикого типа [99], что подтверждает необходимость ГК сигналинга для действия ФМТ на прорастание семян. В заключении можно сказать, что ФМТ повышает устойчивость семян при их прорастании в неблагоприятных условиях, главным образом, путем регулирования соотношения АБК и ГК и оказания позитивного эффекта на гены компонентов сигнальных систем этих фитогормонов.

Цветение является критическим этапом в жизненном цикле растений и зависит от очень многих факторов. ФМТ участвует в регуляции цветения, защите цветочных органов от светового стресса и координации развития гаметофитов. Точная роль ФМТ при индукции или задержке цветения, вероятно, зависит от условий, в которых функционирует ФМТ. На первом этапе было необходимо уяснить, нет ли корреляции между уровнем ФМТ, развитием цветка и переходом к цветению. На растениях риса было изучено содержание ФМТ на разных репродуктивных стадиях и было найдено, что содержание ФМТ в цветке было в шесть раз выше, чем в листьях [100]. На основании этих результатов авторы предположили, что ФМТ может участвовать в регуляции времени цветения, и эта идея была подтверждена в следующем эксперименте.

Трансгенные растения риса, сверхэкспрессирующие ген *SNAT* овцы, имели уровень эндогенного ФМТ в три раза выше, чем растения дикого типа. Цветение этих трансгенных линий было задержано на одну неделю [101]. Задержка цветения ФМТ подтверждается и тем, что мутантные растения *A. thaliana comt1* и *snat1*, которые имеют меньшую эндогенную концентрацию ФМТ, показали более раннее цветение, чем растения дикого типа Col-0. Фенотип раннего цветения этих мутантных растений мог быть восстановлен применением экзогенного ФМТ (10, 20 или 50 мкМ) [102].

Проф. Shi с коллегами [103] впервые показали прямое участие ФМТ в регуляции цветения. Растения *A. thaliana*, обработанные 500 мкМ ФМТ, зацвели на 5 дней позже по сравнению с контрольными растениями. Было показано участие белков DELLA и Flowering Locus C (FLC) в опосредованном ФМТ цветении у *A. thaliana*. ФМТ увеличивал стабилизацию двух белков DELLA (RGA и RGL3), не регулируя экспрессию кодирующих их генов. К тому же, экзогенный ФМТ не оказал значительного влияния на уровень эндогенной ГК, то есть влияние ФМТ на белки DELLA, возможно, не зависели от ГК. Белок FLC действует как сильный репрессор, задерживающий цветение. Он связывается непосредственно с промоторными областями гена *FLOWERING LOCUS T (FT)*, который кодирует центральный компонент флоригена. Транскрипция *FLC* усиливалась при обработке растений ФМТ, как и транскрипция связанных с *FLC* генов *MAF3* и *MAF4*, что привело к задержке цветения у *A. thaliana* [102]. CRISPR/cas9-редактированные растения и сверхэкспрессирующая линия *PMTR1* показывали более раннее и более позднее цветение, соответственно, чем *A. thaliana* дикого типа Col-0 [44]. Это указывает на возможное участие рецептора *PMTR1* в ФМТ-опосредованной задержке времени цветения.

Следовательно, задержка цветения под действием ФМТ происходит через экспрессию *FLC*, которая запускается, когда уровень эндогенного ФМТ превышает пороговую концентрацию [100].

Фитомелатонин и жасмонаты

Жасмонаты – метилжасмонат (МЖ) и жасмоновая кислота (ЖК), участвуют в защитных реакциях растений, в развитии корневой системы, цветении и формировании плодов [104]. ФМТ и жасмонаты имеют довольно сложные взаимодействия. Антагонизм между ФМТ и ЖК обнаружен в регуляции накопления антоцианов в *A. thaliana*. ФМТ подавлял индуцированное ЖК (в 20 раз) накопление антоцианов [105]. При этом ФМТ не влиял на вызванную ЖК де-

градацию белков JAZ, не ускорял катаболизм антоцианов, но оказывал негативное влияние на их биосинтез. Причем уровень антоцианов в мутантных линиях *A. thaliana* как сверхэкспрессирующих ген *SNAT* (*MsSNAT-1* и *MsSNAT-2*), так и в линиях с инактивированным геном *snat*, был такой же, как в растениях дикого типа. Несмотря на это, индуцированное ЖК накопление антоцианов было снижено в трансгенных линиях со сверхэкспрессией гена *SNAT*.

ФМТ снижал накопление ЖК у *Brassica napus* в условиях солевого стресса. При этом он индуцировал биосинтез белков JAZ, которые подавляют ответ, опосредованный ЖК, что приводило к повышению солеустойчивости растений [66]. Аналогичным образом, обработка ФМТ пальчатой травы *Cynodon dactylon* (L.) Pers. вызывала подавление уровня белков JAZs, что способствовало повышению стрессоустойчивости растений [106]. В проростках дыни при избытке меди обработка ФМТ ингибировала биосинтез линолевой кислоты, снижала экспрессию генов липоксигеназы, тем самым уменьшая содержание ЖК и способствуя развитию боковых корней [107]. Обработка экзогенным ФМТ растений арбуза вызывала накопление эндогенного ФМТ, который способствовал увеличению содержания МЖ и повышению устойчивости к холоду. Предполагается, что МЖ увеличивает накопление ФМТ, вызывая образование самоусиливающейся петли обратной связи, которая участвует в холодоустойчивости [108].

Как видно из результатов, обнаружен как синергический, так и антагонистический характер взаимодействия между ФМТ и ЖК в условиях стресса. Предполагается, что ФМТ замедляет или подавляет действие ЖК, ингибируя синтез ЖК и синтез JAZ белков. Следует отметить, что взаимодействие ФМТ и ЖК очень важны и при биотическом стрессе.

Фитомелатонин и салициловая кислота

Салициловая кислота (β -гидрокси фенольная кислота, СК) имеет широкий спектр биологической активности. Она участвует не только в регуляции процессов роста и развития, но и в защите растений в условиях абиотического и биотического стрессов, при этом часто взаимодействуя с ФМТ. Эти два фитогормона в своем синтезе имеют общего предшественника – хоризмовую кислоту.

Хотя основная роль СК связана с биотическими стрессами и патогенезом, есть данные по взаимодействию ФМТ и СК и в условиях абиотических стрессов. Например, ФМТ повышал содержание СК и увеличивал экспрессию гена биосинтеза СК *PAL2* во время теплового стресса в проростках сои [109] и рапса при солевом

стрессе [110]. Было показано, что ФМТ и СК повышали устойчивость растений перца к изыткту мышьяка (As), оказывая позитивное влияние на основные метаболические процессы и активируя рост перца [111]. Взаимосвязь между ФМТ и СК изучена во время стрессовых реакций (прорастание семян, фотосинтез, рост растений и старение) [112]. ФМТ и СК играют важную роль в повышении стресс устойчивости растений, оказывая активирующее влияние на накопление хлорофилла, процесс фотосинтеза, фиксацию азота и отдельные метаболические пути.

Реакция растений на биотический стресс регулируется СК. При воздействии ФМТ увеличивается синтез СК, ЖК и этилена. С другой стороны, ФМТ и СК накапливаются в растениях в ответ на патогенное воздействие. Предыдущие исследования показали решающую роль ФМТ в защите растений от биотического стресса.

Защитный ответ растений регулируется множеством сигнальных путей, в которых задействованы СК, ЖК и этилен. Чтобы определить, с каким из этих путей взаимодействует ФМТ в защите растений от патогенов, использовали три мутанта *A. thaliana*, в которых были инактивированы гены рецептора СК (*npr1*), рецептора этилена (*ein2*), и митоген-активируемой протеинкиназы 6 (*mpk6*). У мутанта *npr1* индукция экспрессии защитных генов (*PR1*, *ICS1*, *GST1*) ФМТ полностью отсутствовала, а у мутанта *ein2* была значительно снижена. Это показывает, что защитный эффект, опосредованный ФМТ определяется СК, но этилен в нем тоже может быть задействован [113].

Инокуляции авирулентным патогеном *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000* мутантных линий *A. thaliana* с инактивированным геном *SNAT* (*shat-1* и *snat-2*) привела к большей восприимчивости мутантов к патогену, и это совпало с падением экспрессии защитных генов, включая *PR1*, *ICS1* (изохоризматсинтазы 1) и *PDF1.2* (растительный дефенсин), однако обработка экзогенным ФМТ восстановила индукцию экспрессии защитных генов в *SNAT*-мутантах. Поскольку ФМТ действует выше по ходу сигнального пути относительно синтеза СК, то снижение уровня ФМТ в мутантах могло привести к снижению синтеза СК и ослаблению экспрессии защитных генов. Кроме того, ФМТ не смог индуцировать защитные гены в мутанте с дефицитом СК (*nahG*). Эти результаты подтверждают, что вызванная ФМТ устойчивость в ответ на атаку авирулентных патогенов у *Arabidopsis* зависит от СК [114].

Как показали Kong с коллегами [45], инактивация генов, кодирующих рецепторы ФМТ *N. benthamiana* (trP47363 и trP13076), нару-

шает экспрессию гена *PR-1a* и накопление СК. Это означает, что индукция защитных реакций в *N. benthamiana* происходит с участием рецепторов ФМТ.

Следовательно, изучение роли ФМТ в повышении устойчивости растений к биотическому стрессу – очень перспективное и быстро развивающееся направление.

Фитомелатонин и этилен

Этилен – уникальный газообразный фитогормон, участвующий в регуляции многих физиологических процессов, таких как созревание плодов, развитие корневой системы, старение, опадание листьев, и, кроме того, вместе с другими регуляторами этилен обеспечивает устойчивость растений к неблагоприятным условиям. О функции этилена и механизме его действия имеется достаточно много литературы. Мы рассмотрим несколько примеров, чтобы показать, насколько разнообразно взаимодействие ФМТ и этилена.

ФМТ задерживал старение цветной китайской капусты (*Brassica rapa*, cv. *chinensis*), увеличивая биосинтез флавоноидов и задерживая распад хлорофилла. Позитивный эффект был достигнут подавлением действия этилена, который ускорял старение листьев. ФМТ снижал экспрессию генов биосинтеза этилена (*BrSAMS2.1*, *BrSAMS2.2*, *BrACS5*, *BrACS10*, *BrACO2* и *BrACO5*) и активировал основные гены биосинтеза флавоноидов (*BrFLS1*, *BrFLS3.2*). Эта активация была, хотя бы частично, обеспечена тем, что ФМТ подавлял экспрессию генов важнейших факторов ответа на этилен (*BrERF2*, *BrERF109*), которые связывались с промоторами генов *BrFLS1* и *BrFLS3.2* и являлись их негативными регуляторами [115].

Экзогенный ФМТ оказывает значительное влияние на созревание и качество плодов. Обработка плодов томатов ФМТ изменяла параметры созревания плодов, вкусовые качества, а также сигналинг этилена и ферментов его биосинтеза [116].

ФМТ ослаблял повреждающее действие осмотического стресса на томатах (*Solanum lycopersicum* L. cv. *Micro-Tom*). ПЭГ 6000 подавлял рост растений и ухудшал функциональные характеристики ФСЦ, однако ФМТ, оказывая защитное действие, увеличил скорость роста и нормализовал функционирование фотосистемы. Сравнительный транскриптомный анализ показал, что уровни экспрессии большинства дифференциально экспрессирующихся генов, связанных с гормонами, были повышены после обработки ПЭГ 6000 и вернулись к нормальному значению после обработки ФМТ. Экспрессия пяти генов, имеющих отношение к механизму действия этилена, повышалась под влиянием

осмотического стресса, тогда как ФМТ снижал их экспрессию [117].

Согласно данным Ху с соавт. [118], ФМТ способствовал синтезу этилена для преодоления солевого стресса у виноградной лозы. Это достигалось активацией экспрессии генов основного фермента биосинтеза этилена *ACS1* и *транс*-фактора MYB108A. Совсем другой характер взаимодействия между ФМТ и этиленом наблюдался в растениях люцерны, которые в ходе опыта находились в условиях избыточного увлажнения почвы. ФМТ подавлял накопление этилена, ингибируя экспрессию двух генов ферментов его биосинтеза *ACS* и *ACO* [119].

Молекулярные механизмы взаимодействия ФМТ и этилена в регуляции вторичного метаболизма плодов недостаточно изучены. Максимальное накопление ФМТ и этилена в кожице ягод винограда приходилось на 70 день после начала цветения [120]. По данным метабономики 25 метаболитов, образовавшихся в ответ на обработку ФМТ, зависели от этилена. Анализ RNA-seq показал, что ФМТ регулирует пути трансдукции сигнала гормонов растений и биосинтеза вторичных метаболитов через этилен. Было предположено, что ФМТ-активируемые гены *транс*-фактора VvMYB14 и фермента биосинтеза этилена VvACS1 (1-аминоциклопропан-1-карбоксилат синтаза 1) вовлечены в регуляцию вторичного метаболизма. Сверхэкспрессия *VvMYB14* значительно увеличивала образование этилена. Показано, что ФМТ индуцирует экспрессию гена *VvMYB14*, а кодируемый им *транс*-фактор связывался с промотором гена *VvACS1* и обеспечивал накопление этилена, транскрипционно активируя *VvACS1*, тем самым оказывая влияние на накопление вторичных метаболитов. Большое количество исследований на различных видах растений показали, что этилен регулирует накопление вторичных метаболитов

Этилен, как и ФМТ, играет важную роль в повышении устойчивости растений к патогенам. Weeda с соавт. [68] показали, что большинство идентифицированных генов пути биосинтеза и сигналинга этилена в ответ на обработку ФМТ были повышены в растениях *A. thaliana*. Гены, индуцированные ФМТ и реагирующие на патогены, были частично подавлены в мутанте *A. thaliana ein2* с инактивированным ключевым компонентом сигнального пути этилена. Было показано, что гены *RAV*, кодирующие факторы ответа на этилен (*ERFs*), необходимы для устойчивости к бактериальному поражению маниока через индуцированную экспрессию генов биосинтеза ФМТ. Таким образом, сигналы этилена могут функционировать синергично с ФМТ для модуляции генов устойчивости к болезням [87].

ФИТОМЕЛАТОНИН – НОВЫЙ ФИТОГОРМОН

После рассмотрения информации, характеризующей ФМТ как биологически активную молекулу, хотелось бы попытаться ответить на вопрос: “Можно ли ФМТ считать фитогормоном?”

По нашему мнению, к фитогормонам можно отнести эндогенные низкомолекулярные сигнальные молекулы, которые в низких концентрациях, взаимодействуя как с факторами внешней среды, так и с эндогенными сигналами, участвуют в регуляции широкого спектра процессов роста и развития растений. ФГ могут синтезироваться в любой части растения и осуществлять свою регуляторную активность как в месте синтеза, так и в отдаленных органах растения.

В настоящее время “статус” ФМТ широко обсуждается. Примерно в одной трети статей, в которых рассматривается данный вопрос, ФМТ относят к классу ФГ. Некоторые авторы считают, что ФМТ пока нельзя считать ФГ. Они, вероятно, опираются на рекомендации ряда ученых [121], которые, рассматривая историю открытия и изучения “классических” фитогормонов, считают, что для отнесения новых физиологически-активных соединений к фитогормонам, необходимо кроме физиологической активности знать их биосинтез, катаболизм, транспорт, наличие рецепторов и сигналинг. Это, безусловно, желательно, но такой подход предполагает глубокое знание механизма их действия, что до настоящего времени остается актуальным для всех известных фитогормонов. Из истории изучения ФГ видно, что признание того или иного соединения фитогормоном намного опережало понимание механизма его действия. Например, рецепторы почти всех ФГ были открыты не менее, чем через 30–50 лет после того, как эти соединения были отнесены к классу фитогормонов. В отношении ФМТ ситуация значительно лучше, поскольку к настоящему времени накоплена огромная информация о ФМТ, в том числе уже идентифицирован и активно изучается рецептор фитомелатонина [41, 43, 49].

Далее постараемся кратко обосновать, почему ФМТ можно считать фитогормоном. При этом будем опираться, прежде всего, на статьи, которые довольно детально рассматривают данный вопрос [8, 9, 41, 43, 49, 55, 60, 89, 122–126].

Фитомелатонин имеет многообразную функциональную активность. Это свойство характерно для каждого фитогормона. Плейотропность ФМТ описана в огромном количестве публикаций. В нашем обзоре описание взаимодействия ФМТ с каждым из ФГ показывает невероятную функциональную многогранность ФМТ. Трудно

найти такой физиологический процесс в растении, в регуляции которого не участвовал бы ФМТ. Причем многие эффекты ФМТ, хотя бы частично, реализуются через взаимодействие с другими фитогормонами [8–11, 60, 79, 82, 126].

В 2018 г. китайские ученые выделили из *A. thaliana* рецептор фитомелатонина PMTR1/CAND2 [41], что явилось огромным шагом вперед в понимании механизма действия ФМТ и в признании его гормоном растений. В разделе “Рецептор фитомелатонина” мы кратко рассмотрели имеющиеся результаты, посвященные рецепторной роли PMTR1/CAND2. Хотелось бы отметить две недавние статьи [43, 45], авторы которых подробно проанализировали данный вопрос и очень оптимистично настроены в отношении признания PMTR1/CAND2 рецептором ФМТ. Вероятно, в недалеком будущем PMTR1/CAND2 всеми будет признан в качестве рецептора ФМТ.

Уровень любого фитогормона обычно определяется соотношением скорости его синтеза и распада. Основной путь биосинтеза ФМТ у растений включает следующую последовательность превращений: Триптофан→Триптамин→Серотонин→N-ацетилсеротонин→Фитомелатонин. В настоящее время активно изучается метаболизм ФМТ. В растениях были идентифицированы 2-, 4- и 6-гидроксимелатонин, а также N-ацетил-N-формил-5-метоксикинурамин. Метаболиты ФМТ могут образоваться как ферментативными, так и неферментативными реакциями. Все метаболиты физиологически активны и вместе с ФМТ участвуют в защите растений от избытка АФК.

Известно, что ФГ могут находиться в растении в виде конъюгатов. В форме конъюгатов они могут быть как активными, так и не активными. Пока не обнаружены конъюгаты фитомелатонина, но со временем они, возможно, будут найдены.

Фитогормоны действуют в низких концентрациях. Однако в случае ФМТ следует оговориться, что он действует в низких концентрациях, как фитогормон, регулируя физиологические процессы, а не выступая в роли антиоксиданта (как эти две функции у ФМТ сочетаются, пока не ясно). ФГ могут действовать в концентрации от 0.01 до 10 мкМ, однако эффективная концентрация ФГ и ФМТ определяется многими причинами. По нашему опыту, БС и ГК обычно используются в более низких концентрациях, чем, например, ЦК или ауксин. Оптимальная концентрация зависит от вида растения, стадии развития растения и регулируемого процесса (например, прорастание семян, деление клеток и старение листьев), от способа обработки растения ФМТ (например, введение в питательную среду или опрыскивание). Ответ растения на ФМТ, безусловно, зависит от эндогенного со-

держания ФМТ в момент обработки растения. Исследователи почти всегда имеют дело с экзогенной концентрацией ФМТ, хотя идеально было бы знать эндогенный уровень ФМТ. Эффективность проникновения ФМТ при любом способе обработки растения очень трудно определить. Кроме того, мало известна судьба ФМТ в клетках растений. Он может поступать, например, в хлоропласты, митохондрии, вакуоли, ЭПР и другие компоненты клетки, а также может связываться, например, с PR10 белками [93], кальмодулином, и, возможно, часть ФМТ будет инактивирована. По этой причине очень трудно определить эффективную концентрацию ФМТ внутри клетки, однако это необходимо для дальнейшего изучения механизма действия. Очень полезное обсуждение вопроса соотношения эффективной концентрации ФМТ и ответа растения на эту концентрацию приводится в недавнем обзоре [49].

В отличие от “классических” фитогормонов ФМТ обладает очень мощным антистрессовым эффектом и большой вариабельностью концентраций не только у разных видов растений, но даже внутри одного вида. Так, например, среди 298 образцов маниока, произрастающих в разных природных условиях, уровень ФМТ в клубневидных корнях колебался от 38.35 до 7073.30 нг/г сырого веса [33]. Это, вероятно, помогает ФМТ более активно бороться за выживание растений в неблагоприятных условиях, но создает немалые трудности при изучении механизма его действия. Давно обсуждается вопрос о том, как ФМТ реализует свою гормональную активность при его высокой концентрации в растении, но пока ответа на этот вопрос нет [11, 17]. Предполагается существование множественных сайтов связывания мелатонина, которые требуют различные концентрации насыщения. При очень высоких концентрациях ФМТ любой физиологически значимый ФМТ-связывающий сайт должен быть насыщенным и в таком случае любые умеренные изменения концентрации ФМТ не будут восприниматься растительной клеткой в плане передачи ФМТ сигнала. Определение физиологически эффективных концентраций фитомелатонина в клетке очень важно. Ранее мы уже обсуждали, что важно знать относительные доли ФМТ в цитоплазме, вакуоли, апопласте, а также митохондриях и хлоропластах. Такая информация была бы полезна для познания механизма действия ФМТ.

Транспорт ФМТ очень важен для понимания его роли в регуляции физиологических процессов у растений, но он практически не изучен. Например, Li и коллеги [127] показали, что добавление ФМТ к корневой системе растения арбуза вызывало индукцию экспрессии генов, реагирующих на холод, в листьях, которые не



Рис. 2. Фитомелатонин – новый фитогормон. Существуют требования к биологически-активным соединениям, которые могут быть отнесены к фитогормонам [121], однако некоторые из требований, по нашему мнению, завышены, и ФМТ может считаться новым фитогормоном, опираясь на следующие признаки: 1) известен рецептор ФМТ; 2) он является плейотропной молекулой, которая участвует в регуляции многих физиологических процессов у растений; 3) действие ФМТ зависит от экзогенной или эндогенной концентрации регулятора; 4) известны пути его биосинтеза и частично катаболизма; 5) предполагается, что ФМТ транспортируется по ксилеме; 6) ФМТ в регуляции различных физиологических процессов взаимодействует со всеми основными фитогормонами, включая ауксины, ЦК, ГК, БС, АБК, этилен, СК, жасмонаты и стриголактоны.

подвергались обработке. Авторы предположили, что дальний транспорт ФМТ идет через ксилему, наряду с другими растительными гормонами.

Вся имеющаяся в настоящее время информация о ФМТ, по нашему мнению, позволяет считать ФМТ новым гормоном растений (рис. 2).

Приятно отметить, что такую же позицию занимают многие исследователи, работающие с этим гормоном. Однако называть фитомелатонин “главным регулятором”, “регуляторным хабом” и т.д. не вполне корректно, поскольку в растениях каждый фитогормон выполняет свою специфическую роль, и сказать, важнее для растений цитокинин или ФМТ невозможно и даже ставить так вопрос некорректно. Будущие исследования, внесут ясность в те вопросы, которые сейчас являются дискуссионными. Изучение механизма действия фитомелатонина – это очень перспективное направление исследования, оно активно развивается, поэтому впереди нас ждут новые удивительные открытия.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 23-14-00011). Часть по рецепторам фитомелатонина выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (№ 122042700044-6).

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. Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes // J. Amer. Chem. Soc. 1958. V. 80. P. 2587.

2. *Tan D.X., Zheng X., Kong J., Manchester L.C., Hardeland R., Kim S.J., Xu X., Reiter R.J.* Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. P. 15858. <https://doi.org/10.3390/ijms150915858>
3. *Zhao D., Yu Y., Shen Y., Liu Q., Zhao Z., Sharma R., Reiter R.J.* Melatonin synthesis and function: evolutionary history in animals and plants // *Front. Endocrinol.* 2019. V. 10. P. 249. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00249>
4. *Tan D.X., Manchester L.C., Liu X., Rosales-Corral S.A., Acuna-Castroviejo D., Reiter R.J.* Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes // *J. Pineal Res.* 2013. V. 54. P. 127. <https://doi.org/10.1111/jpi.12026>
5. *Dubbels R., Reiter R.J., Klenke E., Goebel A., Schnakenberg E., Ehlers C. Schiwara H.W., Schloot W.* Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay-liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Pineal Res.* 1995. V. 18. P. 28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1995.tb00136.x>
6. *Hattori A., Migitaka H., Iigo M., Itoh M., Yamamoto K., Ohtani-Kaneko R., Hara M., Suzuki T., Reiter R.J.* Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995. V. 35. P. 627.
7. *Murch S.J., Erland L.A.E.* A Systematic review of melatonin in plants: an example of evolution of literature // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 683047. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.683047>
8. *Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J.* Melatonin in flowering, fruit set and fruit ripening // *Plant Reprod.* 2020. V. 33. P. 77. <https://doi.org/10.1007/s00497-020-00388-8>
9. *Arnao M.B.* Phytomelatonin: discovery, content, and role in plants // *Adv. Bot.* 2014. V. 2014. Article 815769. <https://doi.org/10.1155/2014/815769>
10. *Back K.* Melatonin metabolism, signaling and possible roles in plants // *Plant J.* 2021. V. 105. P. 376. <https://doi.org/10.1111/tjpi.14915>
11. *Hardeland R.* Melatonin in plants and other phototrophs: advances and gaps concerning the diversity of functions // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 627. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru386>
12. *Kanwar M.K., Yu J., Zhou J.* Phytomelatonin: Recent advances and future prospects // *J. Pineal Res.* 2018. V. 65. e12526. <https://doi.org/10.1111/jpi.12526>
13. *Tan D.X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L., Reiter R.J.* Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger // *Endocr. J.* 1993. V. 1. P. 57.
14. *Arnao M.B., Hernández-Ruiz J.* Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: a model for the plant redox network // *Melatonin Res.* 2019. V. 2. P. 152. <https://doi.org/10.1111/plb.13202>
15. *Mannino G., Pernici C., Serio G., Gentile C., Ber- tea C.M.* Melatonin and phytomelatonin: chemistry, biosynthesis, metabolism, distribution and bioactivity in plants and animals // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 9996. <https://doi.org/10.3390/ijms22189996>
16. *Tan D.X., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L.J., Reiter R.J.* One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? // *J. Pineal Res.* 2007. V. 42. P. 28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>
17. *Reiter R.J., Poeggeler B., Tan D.-X., Chen L.-D., Manchester L.C., Guerrero J.M.* Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor // *Neuroendoc. Lett.* 1993. V. 15. P. 103. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-2-151>
18. *Back K., Tan D.-X., Reiter R.J.* Melatonin biosynthesis in plants: Multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts // *J. Pineal Res.* 2016. V. 61. P. 426. <https://doi.org/10.1111/jpi.12364>
19. *Yang X., Chen J., Ma Y., Huang M., Qiu T., Bian H., Han N., Wang J.* Function, mechanism, and application of plant melatonin: An update with a focus on the cereal crop, barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Antioxidants.* 2022. V. 11. P. 634. <https://doi.org/10.3390/antiox11040634>
20. *Murch S.J., KrishnaRaj S., Saxena P.K.* Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants // *Plant Cell Rep.* 2000. V. 19. P. 698. <https://doi.org/10.1007/s002990000206>
21. *Liu G., Hu Q., Zhang X., Jiang J., Zhang Y., Zhang Z.* Melatonin biosynthesis and signal transduction in plants in response to environmental conditions // *J. Exp. Bot.* 2022. V. 73. P. 5818. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac196>
22. *Murch S.J., Saxena P.K.* A melatonin-rich germplasm line of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) // *J. Pineal Res.* 2006. V. 41. P. 284. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00367.x>
23. *Zhang Z., Zhang Y.* Melatonin in plants: what we know and what we don't // *Food Quality and Safety.* 2021. V. 5. P. 1. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyab009>
24. *Tan D.X., Reiter R.J.* An evolutionary view of melatonin synthesis and metabolism related to its biological functions in plants // *J. Exp. Bot.* 2020. V. 71. P. 4677. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa235>
25. *Ye T., Yin X., Yu L., Zheng S.J., Cai W.J., Wu Y., Feng Y.Q.* Metabolic analysis of the melatonin biosynthesis pathway using chemical labeling coupled with liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Pineal Res.* 2019. V. 66. e12531. <https://doi.org/10.1111/jpi.12531>
26. *Lee K., Back K.* Melatonin-deficient rice plants show a common semidwarf phenotype either dependent or

- independent of brassinosteroid biosynthesis // *J. Pineal Res.* 2019. V. 66. e12537.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12537>
27. Kang K., Kong K., Park S., Natsagdor U., Kim Y.S., Back K. Molecular cloning of a plant N-acetylserotonin methyltransferase and its expression characteristics in rice // *J. Pineal Res.* 2011. V. 50. P. 304.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00841.x>
 28. Zhang T., Wang J., Sun Y., Zhang L., Zheng S. Versatile roles of melatonin in growth and stress tolerance in plants // *J. Plant Growth Regul.* 2022. V. 41. P. 507.
<https://doi.org/10.1007/s00344-021-10317-2>
 29. Gao Y., Chen H., Chen D., Hao G. Genetic and evolutionary dissection of melatonin response signaling facilitates the regulation of plant growth and stress responses // *J. Pineal Res.* 2023. e12850.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12850>
 30. Cai S.Y., Zhang Y., Xu Y.P., Qi Z.Y., Li M.Q., Ahammed G.J., Xia X.J., Shi K., Zhou Y.H., Reiter R.J., Yu J.Q., Zhou J. HsfA1a upregulates melatonin biosynthesis to confer cadmium tolerance in tomato plants // *J. Pineal Res.* 2017. V. 62.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12387>
 31. Wei Y., Liu G., Bai Y., Xia F., He C., Shi H., Foyer C. Two transcriptional activators of N-acetylserotonin O-methyltransferase 2 and melatonin biosynthesis in cassava // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 4997.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx305>
 32. Wei Y., Chang Y., Zeng H., Liu G., He C., Shi H. RAV transcription factors are essential for disease resistance against cassava bacterial blight via activation of melatonin biosynthesis genes // *J. Pineal Res.* 2018. V. 64. e12454.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12454>
 33. Bai Y., Wei Y., Yin H., Hu W., Cheng X., Guo J., Dong Y., Zheng L., Xie H., Zeng H., Reiter R.J., Shi H. PP2C1 fine-tunes melatonin biosynthesis and phyto-melatonin receptor PMTR1 binding to melatonin in cassava // *J. Pineal Res.* 2022. V. 73. e12804.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12804>
 34. Zheng X., Tan D., Allan A.C., Zuo B., Zhao Y., Reiter R.J., Wang L., Wang Z., Guo Y., Zhou J., Shan D., Li Q., Han Z., Kong J. Chloroplastic biosynthesis of melatonin and its involvement in protection of plants from salt stress // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 41236.
<https://doi.org/10.1038/srep41236>
 35. Wang L., Feng C., Zheng X., Guo Y., Zhou F., Shan D., Liu X., Kong J. Plant mitochondria synthesize melatonin and enhance the tolerance of plants to drought stress // *J. Pineal Res.* 2017. V. 63. e12429.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12429>
 36. Tan D.-X., Manchester L.C., Mascio P.D., Martinez G.R., Prado F.M., Reiter R.J. Novel rhythms of N-1-acetyl-N-2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation // *FASEB J.* 2007. V. 21. P. 1724.
<https://doi.org/10.1096/fj.06-7745com>
 37. Hardeland R., Tan D.-X., Reiter R.J. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines // *J. Pineal Res.* 2009. V. 47. P. 109.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00701.x>
 38. Okazaki M., Higuchi K., Aouini A., Ezura H. Lowering intercellular melatonin levels by transgenic analysis of indoleamine 2,3-dioxygenase from rice in tomato plants // *J. Pineal Res.* 2010. V. 49. P. 239.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00788.x>
 39. Byeon Y., Back K. Molecular cloning of melatonin 2-hydroxylase responsible for 2-hydroxymelatonin production in rice (*Oryza sativa*) // *J. Pineal Res.* 2015. V. 58. P. 343.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12220>
 40. Shah A.A., Ahmed S., Yasin N.A. 2-Hydroxymelatonin induced nutritional orchestration in *Cucumis sativus* under cadmium toxicity: modulation of non-enzymatic antioxidants and gene expression // *Int. J. Phytomed.* 2019. V. 22. P. 1.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1683715>
 41. Wei J., Li D.-X., Zhang J.-R., Shan C., Rengel Z., Song Z.-B., Qi Chen Q. Phytomelatonin receptor PMTR1-mediated signaling regulates stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* // *J. Pineal Res.* 2018. e12500.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12500>
 42. Lee H.Y., Back K. The phyto-melatonin receptor (PMTR1) *Arabidopsis* Cand2 is not a bona fide G protein-coupled melatonin receptor // *Melatonin Res.* 2020. V. 3. P. 177.
<https://doi.org/10.32794/mr11250055>
 43. Khan D., Cai N., Zhu W., Li L., Guan M., Pu X., Chen Q. The role of phyto-melatonin receptor 1-mediated signaling in plant growth and stress response // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14. P. 1142753.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1142753>
 44. Yin X., Bai Y.L., Gong C., Song W., Wu Y., Ye T., Feng Y.Q. The phyto-melatonin receptor PMTR1 regulates seed development and germination by modulating abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana* // *J. Pineal Res.* 2022. V. 72. e12797.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12797>
 45. Kong M., Sheng T., Liang J., Ali Q., Gu Q., Wu H., Chen J., Liu J., Gao X. Melatonin and its homologs induce immune responses via receptors trP47363-trP13076 in *Nicotiana benthamiana* // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 1197.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.691835>
 46. Wang L.F., Lu K.K., Li T.T., Zhang Y., Guo J.X., Song R.F., Liu W.C. Maize PHYTOMELATONIN RECEPTOR1 functions in plant osmotic and drought stress tolerance // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 73. P. 5961.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erab553>
 47. Bychkov I.A., Kudryakova N.V., Shugaev A.G., Kuznetsov V.I., Kusnetsov V.V. The melatonin receptor CAND2/PMTR1 is involved in the regulation of mitochondrial gene expression under photooxidative stress // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2022. V. 502. P. 15.
<https://doi.org/10.1134/S1607672922010021>
 48. Bychkov I., Kudryakova N., Pojidaeva E., Kusnetsov V. The melatonin receptor CAND2 is involved in the

- regulation of photosynthesis and chloroplast gene expression in *Arabidopsis thaliana* under photooxidative stress // Photosynth. 2021. V. 59. P. 683.
<https://doi.org/10.32615/ps.2021.061>
49. Park W.J. Have all of the phytohormonal properties of melatonin been verified? // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. P. 3550.
<https://doi.org/10.3390/ijms25063550>
 50. Yu R., Zuo T., Diao P., Fu J., Fan Y., Wang Y., Zhao Q., Ma X., Lu W., Li A., Wang R., Yan F., Pu L., Niu Y., Wuriyanghan H. Melatonin enhances seed germination and seedling growth of *Medicago sativa* under salinity via a putative melatonin receptor MsPMTR1 // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 702875.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702875>
 51. Yang Q., Peng Z., Ma W., Zhang S., Hou S., Wei J., Dong S., Yu X., Song Y., Gao W., Rengel Z., Huang L., Cui X., Chen Q. Melatonin functions in priming of stomatal immunity in *Panax notoginseng* and *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 2021. V. 87. P. 2837.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab419>
 52. Skoog F., Miller C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro // Sympos. Soc. Exptl. Biol. 1957. V. 11. P. 118.
 53. Hernández-Ruiz J., Cano A., Arnao M.B. Melatonin: A growth-stimulating compound present in lupin tissues // Planta. 2004. V. 220. P. 140.
<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1317-3>
 54. Arnao M.B., Hernández-Ruiz J. The physiological function of melatonin in plants // Plant Signal. Beh. 2006. V. 1. P. 89.
 55. Arnao M.B., Hernández-Ruiz J. Melatonin and its relationship to plant hormones // Ann. Bot. 2018. V. 121. P. 195.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcx114>
 56. Wang Y., Reiter R.J., Chan Z. Phytomelatonin: a universal abiotic stress regulator // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. P. 963.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx473>
 57. Sun H., Jia M., Wang Y., Lu H., Wang H. The complexity of melatonin and other phytohormones crosstalk with other signaling molecules for drought tolerance in horticultural crops // Scientia Horticulturae. 2023. V. 321. P. 112348.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112348>
 58. Lauren A.E., Erland A., Praveen K., Saxena A., Susan J., Murch B.C. Melatonin in plant signalling and behavior // Funct. Plant Biol. 2017. V. 45. P. 58.
<https://doi.org/10.1071/FP16384>
 59. Zeng H., Bai Y., Wei Y., Reiter R.J., Shi H. Phytomelatonin as a central molecule in plant disease resistance // J. Exp. Bot. 2022. V. 73. P. 5874.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erac111>
 60. Samanta S., Roychoudhury A. Crosstalk of melatonin with major phytohormones and growth regulators in mediating abiotic stress tolerance in plants // V. South Afric. J. Bot. 2023. V. 163. P. 201.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.10.040>
 61. Khan M., Ali S., Manghwar H., Saqib S., Ullah F., Ayaz A., Zaman W. Melatonin function and crosstalk with other phytohormones under normal and stressful conditions // Genes. 2022. V. 13. P. 1699.
<https://doi.org/10.3390/genes13101699>
 62. Arnao M.B., Hernández-Ruiz J. Growth activity, rooting capacity, and tropism: three auxinic precepts fulfilled by melatonin // Acta Physiol. Plant. 2017. V. 39. P. 127.
<https://doi.org/10.1007/s11738-017-2428-3>
 63. Wang L., Zhao Y., Reiter R.J., He C., Liu G., Lei Q., Zuo B., Zheng X.D., Li, Q., Kong J. Changes in melatonin levels in transgenic Micro-Tom tomato overexpressing ovine AANAT and ovine HIOMT genes // J. Pineal Res. 2014. V. 56. P. 134.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12105>
 64. Chen Q., Qi W.B., Reiter R.J., Wei W., Wang B.M. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indole acetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea* // J. Plant Physiol. 2009. V. 166. P. 324.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.06.002>
 65. Hernández-Ruiz J., Cano A., Arnao M.B. Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species // J. Pineal Res. 2005. V. 39. P. 137.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00226.x>
 66. Tan X., Long W., Zeng L., Ding X., Cheng Y., Zhang X., Zou X. Melatonin-induced transcriptome variation of rapeseed seedlings under salt stress // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 5355.
<https://doi.org/10.3390/ijms20215355>
 67. Liang C., Li A., Yu H., Li W., Liang C., Guo S., Zhang R., Chu C. Melatonin regulates root architecture by modulating auxin response in rice // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 134.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00134>
 68. Weeda S., Zhang N., Zhao X., Ndip G., Guo Y., Buck G.F., Fu C., Ren S. *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems // PLoS One. 2014. V. 9. e93462.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093462> (73)
 69. Pelagio-Flores R., Muñoz Parra E., Ortíz-Castro R., López-Bucio J. Melatonin regulates *Arabidopsis* root system architecture likely acting independently of auxin signaling // J. Pineal Res. 2012. V. 53. P. 279.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00996.x>
 70. Yang L., You J., Li J., Wang Y., Chan Z. Melatonin promotes *Arabidopsis* primary root growth in an IAA-dependent manner // J. Exp. Bot. 2021. V. 72. P. 5599.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erab196>
 71. Mao J., Niu C., Li K., Chen S., Tahir M.M., Han M., Zhang D. Melatonin promotes adventitious root formation in apple by promoting the function of Md-WOX11 // BMC Plant Biol. 2020. V. 20. P. 536.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02747-z>
 72. Zia S.F., Berkowitz O., Bedon F., Whelan J., Franks A.E., Plummer K.M. Direct comparison of *Arabidopsis* gene expression reveals different responses to melatonin

- versus auxin // BMC Plant Biol. 2019. V. 19. P. 567.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-2158-3>
73. Shi H., Zhang S., Lin D., Wei Y., Yan Y., Liu G., Reiter R.J., Chan Z. Zinc finger of *Arabidopsis thaliana* is involved in melatonin-mediated auxin signaling through interacting INDETERMINATE DOMAIN15 and INDOLE-3-ACETICACID17 // J. Pineal Res. 2018. V. 65. e12494.
 74. Shi H., Reiter R.J., Tan D.X., Chan Z. INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 17 positively modulates natural leaf senescence through melatonin-mediated pathway in *Arabidopsis* // J. Pineal Res. 2015. V. 58. P. 26.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12188>
 75. Banerjee A., Roychoudhury A. Melatonin application reduces fluoride uptake and toxicity in rice seedlings by altering abscisic acid, gibberellin, auxin and antioxidant homeostasis // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 145. P. 164.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.033>
 76. Moussa H.R., Algamal S.M.A. Does exogenous application of melatonin ameliorate boron toxicity in spinach plants? // Int. J. Veg. Sci. 2017. V. 23. P. 233.
<https://doi.org/10.3390/molecules25225359>
 77. Ahmad S., Wang G.Y., Muhammad I., Farooq S., Kamran M., Ahmad I., Zeeshan M., Javed T., Ullah S., Huang J.H., Zhou X.B. Application of melatonin-mediated modulation of drought tolerance by regulating photosynthetic efficiency, chloroplast ultrastructure, and endogenous hormones in maize // Chem. Biol. Technol. Agric. 2022. V. 9. P. 5.
<https://doi.org/10.1186/s40538-021-00272-1c>
 78. Zhang H.J., Zhang N., Yang R.C., Wang L., Sun Q.Q., Li D.B., Cao Y.Y., Weeda S., Zhao B., Ren S., Guo Y.D. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA- interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // J. Pineal Res. 2014. V. 57. P. 269.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12167>
 79. Chen L., Lu B., Liu L., Duan W., Jiang D., Li J., Zhang K., Sun H., Zhang Y., Li C., Bai Z. Melatonin promotes seed germination under salt stress by regulating ABA and GA(3) in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 162. P. 506.
 80. Ahmad I., Song X., Hussein I.M.E., Jamal Y., Younas M.U., Zhu G., Zhou G., Ali A.Y. The role of melatonin in plant growth and metabolism, and its interplay with nitric oxide and auxin in plants under different types of abiotic stress // Front Plant Sci. 2023. V. 14. P. 1108507.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1108507>
 81. Zhang J., Shi Y., Zhang X., Du H., Xu B., Huang B. Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) // Environ. Exp. Bot. 2017. V. 138. P. 36.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.012>
 82. Tan X.-L., Fan Z.-Q., Kuang J.-F., Lu W.-J., Reiter R.J., Lakshmanan P., Su X.-G., Zhou J., Chen J.Y., Shan W. Melatonin delays leaf senescence of Chinese flowering cabbage by suppressing ABFs-mediated abscisic acid biosynthesis and chlorophyll degradation // J. Pineal Res. 2019. V. 67. e12570.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12570>
 83. Li C., Tan D.-X., Liang D., Chang C., Jia D., Ma F. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 669.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru476> 2014
 84. Fu J., Wu Y., Miao Y., Yamei Xu Y., Zhao E., Wang J., Sun H., Liu Q., Xue Y., Xu Y., Hu T. Improved cold tolerance in *Elymus nutans* by exogenous application of melatonin may involve ABA-dependent and ABA-independent pathways // Scientif. Rep. 2017. V. 7. P. 39865.
<https://doi.org/10.1038/srep39865>
 85. Li X., Tan D.X., Jiang D., Liu F. Melatonin enhances cold tolerance in drought-primed wild-type and abscisic acid-deficient mutant barley // J. Pineal Res. 2016. V. 61. P. 328.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12350>
 86. Zhao H., Zhang K., Zhou X., Xi L., Wang Y., Xu H., Pan T., Zou Z. Melatonin alleviates chilling stress in cucumber seedlings by up-regulation of CsZat12 and modulation of polyamine and abscisic acid metabolism // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 4998.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05267-3>
 87. Zhao D., Wang H., Chen S., Yu D., Reiter R.J. Phyto-melatonin: an emerging regulator of plant biotic stress resistance // Trends Plant Sci. 2020. V. 26. P. 70.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.08.009>
 88. Park S., Byeon Y., Back K. Functional analyses of three ASMT gene family members in rice plants // J. Pineal Res. 2013. V. 55. P. 409.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12088>
 89. Chen Q., Arnao M.B. Phyto-melatonin: an emerging new hormone in plants // J. Exp. Bot. 2022. V. 73. P. 5773.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erac307>
 90. Arnao M., Hernandez R.J. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves // J. Pineal Res. 2009. V. 46. P. 58.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00625.x>
 91. Ma X., Zhang J., Burgess O., Rossi S., Huang B. Interactive effects of melatonin and cytokinin on alleviating drought induced leaf senescence in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) // Environ. Exp. Bot. 2018. V. 145. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.010>
 92. Bychkov I.A., Andreeva A.A., Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V. Cytokinin modulates responses to phyto-melatonin in *Arabidopsis thaliana* under high light stress // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 738.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010738>
 93. Sliwiak J., Sikorski M., Jaskolski M. PR-10 proteins as potential mediators of melatonin-cytokinin cross-talk in plants: crystallographic studies of LIPR-10.2B isoform from yellow lupine // FEBS J. 2018. V. 285. P. 1907.
<https://doi.org/10.1111/febs.14455>

94. Fu J., Zhang S., Jiang H., Zhang H., Gao H., Yang P., Hu T. Melatonin-induced cold and drought tolerance is regulated by brassinosteroids and hydrogen peroxide signaling in perennial ryegrass // *Environ. Exp. Bot.* 2022. V. 196. P. 104815. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104815>
95. Hwang O.J., Back K. Melatonin is involved in skotomorphogenesis by regulating brassinosteroid biosynthesis in rice plants // *J. Pineal Res.* 2018. V. 65. e12495. <https://doi.org/10.1111/jpi.12495>
96. Hwang O.J., Back K. Melatonin deficiency confers tolerance to multiple abiotic stresses in rice via decreased brassinosteroid levels // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 5173. <https://doi.org/10.3390/ijms20205173>
97. Xiong F., Zhuo F., Reiter R.J., Wang L., Wei Z., Deng K., Song Y., Qanmber G., Feng L., Yang Z., Li F., Ren M. Hypocotyl elongation inhibition of melatonin is involved in repressing brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1082. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01082>
98. Jahan M.S., Shu S., Wang Y., Hasan M.M., El-Yazied A.A., Alabdallah N.M., Hajjar D., Altaf M.A., Sun J., Guo S. Melatonin pretreatment confers heat tolerance and repression of heat-induced senescence in tomato through the modulation of ABA-and GA-mediated pathways // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 112. P. 65095. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.650955>
99. Lv Y., Pan J., Wang H., Reiter R.J., Li X., Mou Z., Zhang J., Yao Z., Zhao D., Yu D. Melatonin inhibits seed germination by crosstalk with abscisic acid, gibberellin, and auxin in *Arabidopsis* // *J. Pineal Res.* 2021. V. 70. e12736. <https://doi.org/10.1111/jpi.12736>
100. Mou Z., Wang H., Chen S., Reiter R.J., Zhao D. Molecular mechanisms and evolutionary history of phyto-melatonin in flowering // *J. Exp. Bot.* 2022. V. 73. P. 5840. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac164>
101. Byeon Y., Back K. An increase in melatonin in transgenic rice causes pleiotropic phenotypes, including enhanced seedling growth, delayed flowering, and low grain yield // *J. Pineal Res.* 2014. V. 56. P. 408. <https://doi.org/10.1111/jpi.12129>
102. Zhang Z., Hu Q., Liu Y., Cheng P., Cheng H., Liu W., Xing X., Guan Z., Fang W., Chen S., Jiang J., Chen F. Strigolactone represses the synthesis of melatonin, thereby inducing floral transition in *Arabidopsis thaliana* in an FLC -dependent manner // *J. Pineal Res.* 2019. V. 67. e12582. <https://doi.org/10.1111/jpi.12582>
103. Shi H., Wei Y., Wang Q., Reiter R.J., He C. Melatonin mediates the stabilization of DELLA proteins to repress the floral transition in *Arabidopsis* // *J. Pineal Res.* 2016. V. 60. P. 373. <https://doi.org/10.1111/jpi.12320>
104. Yang J., Duan G., Li C., Liu L., Han G., Zhang Y., Wang C. The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1349. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349>
105. Ai Y., Zhu Z. Melatonin antagonizes jasmonate-triggered anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *J. Agric. Food. Chem.* 2018. V. 66. P. 5392. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01795>
106. Shi H., Jiang C., Ye T., Tan D.X., Reiter R.J., Zhang H., Liu R., Chan Z. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] by exogenous melatonin // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 681. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru373>
107. Hu Z., Fu Q., Zheng J., Zhang A., Wang H. Transcriptomic and metabolomic analyses reveal that melatonin promotes melon root development under copper stress by inhibiting jasmonic acid biosynthesis // *Hortic. Res.* 2020. V. 7. P. 79. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0293-5>
108. Li H., Guo Y.L., Lan Z., Kai X., Chang J.J., Ahammed G.J., Ma J.X., Wei C., Zhang X. Methyl jasmonate mediates melatonin-induced cold tolerance of grafted watermelon plants // *Hortic. Res.* 2021. V. 8. P. 57. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00496-0>
109. Imran M., Khan M.A., Shahzad R., Bilal S., Khan M., Yun B.W., Khan A.L., Lee I.J. Melatonin ameliorates thermotolerance in soybean seedling through balancing redox homeostasis and modulating antioxidant defense, phytohormones and polyamines biosynthesis // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 5116. <https://doi.org/10.3390/molecules26175116>
110. Park H.S., Kazerooni E.A., Kang S.M., Al-Sadi A.M., Lee I.J. Melatonin enhances the tolerance and recovery mechanisms in *Brassica juncea* (L.) Czern. under saline conditions // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 593717. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.593717>
111. Kaya C., Sarioglu A., Ashraf M., Alyemeni M.N., Ahmad P. The combined supplementation of melatonin and salicylic acid effectively detoxifies arsenic toxicity by modulating phytochelatin and nitrogen metabolism in pepper plants // *Environ. Pol.* 2022. V. 297. P. 118727. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118727>
112. Hernandez-Ruiz J., Arnao M.B. Relationship of melatonin and salicylic acid in biotic/abiotic plant stress responses // *Agronomy.* 2018. V. 8. P. 33. <https://doi.org/10.3390/agronomy8040033>
113. Lee H.Y., Byeon Y., Back K. Melatonin as a signal molecule triggering defense responses against pathogen attack in *Arabidopsis* and tobacco // *J. Pineal Res.* 2014. V. 57. P. 262. <https://doi.org/10.1111/jpi.12165>
114. Lee H.Y., Byeon Y., Tan D.-X., Reiter R.J., Back K. *Arabidopsis* serotonin N-acetyltransferase knockout mutant plants exhibit decreased melatonin and salicylic acid levels // *J. Pineal Res.* 2014. V. 57. P. 262. <https://doi.org/10.1111/jpi.12165>

- cyclic acid levels resulting in susceptibility to an avirulent pathogen // *J. Pineal Res.* 2015. V. 58. P. 291.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12214>
115. Yue L., Kang Y., Zhong M., Kang D., Zhao P., Chai X., Yang X. Melatonin delays postharvest senescence through suppressing the inhibition of BrERF2/BrERF109 on flavonoid biosynthesis in flowering *Chinese cabbage* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 2933.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032933>
116. Sun Q.Q., Zhang N., Wang J., Zhang H.J., Li D.B., Shi J., Li R., Weeda S., Zhao B., Ren S., Guo Y.D. Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 657.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru332>
117. Yang L., Bu S., Zhao S., Wang N., Xiao J., He F., Gao X. Transcriptome and physiological analysis of increase in drought stress tolerance by melatonin in tomato // *PLoS ONE.* 2022. V. 17. e0267594.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267594>
118. Xu L., Xiang G., Sun Q., Ni Y., Jin Z., Gao S., Yao Y. Melatonin enhances salt tolerance by promoting MYB108A-mediated ethylene biosynthesis in grape vines // *Hortic. Res.* 2019. V. 6. P. 114.
<https://doi.org/10.1038/s41438-019-0197-4>
119. Zhang H., Wang L., Shi K., Shan D., Zhu Y., Wang C., Bai Y., Yan T., Zheng X., Kong J. Apple tree flowering is mediated by low level of melatonin under the regulation of seasonal light Signal // *J. Pineal Res.* 2019. V. 66. e12551.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12551>
120. Ma W., Xu L., Gao S., Lyu X., Cao X., Yao Y. Melatonin alters the secondary metabolite profile of grape berry skin by promoting VvMYB14-mediated ethylene biosynthesis // *Hortic. Res.* 2021. V. 8. P. 43.
<https://doi.org/10.1038/s41438-021-00478-2>
121. Ludwig-Müller J., Lüthen H. From facts and false routes: how plant hormone research developed // *J. Plant Growth Regul.* 2015. V. 34. P. 697.
<https://doi.org/10.1007/s00344-015-9544-3>
122. Khanna K., Bhardwaj R., Alam P., Reiter R.J., Ahmad P. Phyto-melatonin: A master regulator for plant oxidative stress management // *Plant Physiol. Biochem.* 2023. V. 196. P. 260.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.01.035>
123. Hardeland R. Melatonin: Another Phytohormone? // *Res. Rev. J. Bot. Sci.* 2016. V. 5.
124. Sun C., Liu L., Wang L., Li B., Jin C., Lin X. Melatonin: A master regulator of plant development and stress responses // *J. Integr. Plant Biol.* 2021. V. 63. P. 126.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12993>
125. Sharma P., Thakur N., Mann N.A., Umar A. Melatonin as plant growth regulator in sustainable agriculture // *Scientia Horticulturae.* 2024. V. 323. P. 112421.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112421>
126. Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator? // *Trends Plant Sci.* 2019. V. 24. P. 38.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.010>
127. Li H., Chang J., Zheng J., Dong Y., Liu Q., Yang X., Wei C., Zhang Y., Ma J., Zhang X. Local melatonin application induces cold tolerance in distant organs of *Citrullus lanatus* L. via long distance transport // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 40858.
<https://doi.org/10.1038/srep40858>

УДК 581.1

ПОГРАНИЧНЫЕ КЛЕТКИ КОРНЕВОГО АПЕКСА: РОЛЬ В СТРАТЕГИЯХ АДАПТАЦИИ И КОРНЕВОМ ИММУНИТЕТЕ

© 2024 г. С. А. Пятин^{а,*}, Е. И. Шишацкая^а, Н. Г. Мензянова^а^аФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

“Сибирский федеральный университет”, Красноярск, Россия

*e-mail: davcbetik@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2024 г.

После доработки 26.06.2024 г.

Принята к публикации 26.06.2024 г.

Пограничные клетки (ПК) – клеточная популяция корневого чехлика, которая в процессе дифференцировки отделяется от поверхности корневого апекса в форме одиночных клеток, небольших агрегатов или клеточных пластов, и переходит в ризосферное пространство. Функциональная активность ПК в ризосфере реализуется через продукцию экзометаболитов. В обзоре обсуждается роль ПК и формирующейся из их экзометаболитов корневого экстраклеточной ловушки в процессах адаптации корневой системы к различным абиотическим факторам и реакциях корневой иммунной системы.

Ключевые слова: корневые пограничные клетки, корневая экстраклеточная ловушка, секретом пограничных клеток, экстраклеточная ДНК

DOI: 10.31857/S0015330324040029, EDN: MOH1PN

ВВЕДЕНИЕ

Пограничные клетки (ПК) – специфическая, метаболически активная клеточная популяция, которая происходит из паренхимальных клеток корневого чехлика и в процессе дифференцировки отслаивается от поверхности корневого чехлика [1]. L. Knudson [2] отмечал, что после отделения от поверхности корневого чехлика эти клетки в течение многих дней сохраняют свою жизнеспособность. Однако в классической ботанике долгое время доминировало представление о ПК как о мертвых “отслаивающихся клетках”, связанных с процессами обновления корневого чехлика [3]. Исследования M.C. Hawes и S.G. Puerckhe [4] подтвердили справедливость предположений L. Knudson. Анализ “отслаивающихся клеток корневого чехлика” 27 видов растений из 10 семейств, включая злаковые, показал, что после отделения от поверхности корневого апекса эти клетки сохраняют высокий уровень жизнеспособности (90–100%) в течение продолжительного времени даже в дистиллированной воде. На синтетических средах выделенные ПК способны пролиферировать и формировать каллус [4]. Современное название “отслаивающихся

клеток корневого чехлика” – пограничные клетки (root border cells) – связано с участием этой клеточной популяции в формировании границы между корнем и ризосферой [3].

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОГРАНИЧНЫХ КЛЕТОК

Морфология отделившихся от поверхности корневого апекса ПК значительно варьирует у разных видов. ПК гороха посевного (*Pisum sativum*) имеют дугообразную форму. Искривление клеток связано с уменьшением толщины базальной клеточной стенки в процессе ее ремоделирования при отделении от поверхности корневого апекса [5]. Для *Arabidopsis thaliana* характерны ПК округлой и удлиненной формы, у льна обыкновенного (*Linum usitatissimum*) встречаются округлые, удлиненные и нитевидные морфотипы ПК [6]. Для различных морфотипов ПК отмечается определенная локализация: округлые (сферические) клетки локализуются на вершине корневого апекса, на боковых поверхностях корневого апекса – удлиненные и нитевидные клетки (степень элонгации ПК увеличивается по мере удаления от вершины апекса). Локализация различных морфотипов ПК не изменяется в условиях стресса [7].

Соотношение морфотипов ПК может изменяться в условиях стресса. Так, в контроль-

Сокращения: ПК – пограничные клетки; ПМЭ – пектинметилэстераза; эксДНК – экстраклеточная ДНК; GalA – α-1,4-связанная D-галактуронозная кислота; NET – нейтрофильная внеклеточная ловушка; RET – корневая экстраклеточная ловушка.

ном варианте в популяции ПК черного тополя (*Populus nigra*) соотношение трех морфотипов (сферические клетки : клетки промежуточной морфологии : удлиненные клетки) составляло (в %) 5.6 : 47.5 : 46.9 соответственно. В условиях осмотического стресса соотношение морфотипов изменялось в зависимости от величины стрессового воздействия. (Для моделирования осмотического стресса в среду культивирования вносили водорастворимый неионный полимер полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 50 и 25 кДа). В условиях сильного осмотического стресса (ПЭГ 50) соотношение морфотипов составляло (в %) 16.9 : 73.9 : 9.2, в условиях умеренного осмотического стресса (ПЭГ 25) – 8.3 : 60.2 : 31.5, соответственно [7].

Каждый морфотип ПК – клеточная субпопуляция с определенным функциональным фенотипом [7]. В популяции ПК черного тополя (*Populus nigra*) морфотип “сферические клетки” характеризовался самой активной секрецией гликополимеров в контроле и в условиях осмотического стресса, по сравнению с двумя другими морфотипами [7]. Кроме того, количественный и качественный спектр гликополимеров для трех морфотипов ПК существенно различался [7]. Закономерности, выявленные в работе Busont и соавт. [7], позволяют предполагать важную роль изменений соотношения морфотипов ПК в адаптивных функциональных перестройках популяции ПК в условиях стресса.

Для ПК возможно несколько вариантов отделения от поверхности корневого апекса: а) в форме одиночных клеток, б) в форме клеточных цепочек, в) в форме клеточного монослоя или небольших монослойных агрегатов. В физиологических условиях у разных видов может доминировать какой-то один вариант отделения, либо наблюдаться несколько вариантов отделения. Так, у *Arabidopsis thaliana* от поверхности корневого чехлика отслаиваются исключительно клеточные пласты. Клетки в составе пластов названы “border-like cells” [8]. У акации (*Acacia mangium*) ПК отделяются в форме монослойных агрегатов. Для сои (*Glycine max*) характерно отделение ПК в форме одиночных клеток и небольших монослойных агрегатов [9]. Следует отметить, что в форме одиночных клеток отделяется морфотип сферических ПК с вершины корневого апекса, а отделение с боковой поверхности апекса в форме монослойных агрегатов характерно для морфотипа удлиненных клеток [10].

Морфология ПК и способы их отделения (в форме одиночных клеток или клеточных агрегатов) зависят от гликополимерного состава клеточной стенки [5]. Так, в клеточных стенках, удлиненных и нитевидных морфотипов ПК, отмечается увеличение содержания рамногалактуронана (по сравнению с округлыми мор-

фотипами), гликополимера, с которым связаны процессы элонгации клеток. Гликополимер гомогалактуронан играет важную роль в процессах клеточной адгезии. Уменьшение содержания в клеточной стенке гомогалактуронана определяет отслаивание одиночных клеток. Увеличение содержания в клеточной стенке этого гликополимера нарушает процессы разделения клеток – ПК отделяются в форме однослойных агрегатов [5].

Увеличение активности отделения ПК в форме цепочек и монослойных агрегатов наблюдается и под воздействием различных абиотических факторов [11].

ЧИСЛЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ ПОГРАНИЧНЫХ КЛЕТОК

Свободные ПК – динамичная клеточная популяция, ее численность значительно варьирует у разных видов в условиях физиологической нормы и под воздействием биотических/абиотических факторов.

Процесс роста корня характеризуется определенной, видоспецифической динамикой численности популяции свободных ПК. У гороха посевного в течение первых 20 ч прорастивания рост корня в длину сопровождается увеличением численности популяции свободных ПК. Через 20 ч прорастивания численность популяции ПК выходит на плато и не изменяется в процессе дальнейшего роста корня [3]. У *Arabidopsis thaliana* отделение ПК (в составе пластов) от поверхности корневого апекса начинается на 5 сутки роста корня, а на 13–15 сутки образуется 3 пласта ПК [8].

Активность суточной продукции ПК характеризуется видовой вариабельностью. С поверхности одного корневого апекса хлопчатника обыкновенного (*Gossypium hirsutum*) (семейство Malvaceae) отслаивается 8000–10000 ПК в сутки, у представителей семейства *Solanaceae* – всего лишь 100 ПК [3]. У репы (*Brassica rapa*) (семейство Brassicaceae) ПК с поверхности корневого апекса не отслаиваются [12]. Как правило, виды, принадлежащие к одному семейству, существенно не отличаются друг от друга по численности популяции ПК. Например, количество ПК у сои и фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), принадлежащих к семейству Fabaceae, составляет 2900–3700 клеток и 2700–3500 клеток соответственно [12].

Видовая вариабельность численности популяции ПК связана с типом организации апикальной меристемы. У видов с открытым типом апикальной меристемы (семейства Fabaceae, Malvaceae и др.) численность ПК значительно выше, чем у видов с закрытым типом (семейства Solanaceae, Brassicaceae) [13].

Тип апикальной меристемы и количество ПК могут определять устойчивость растений к тяжелым металлам. Feng с соавт. [13] показали более высокую устойчивость к кадмию для видов с открытым типом апикальной меристемы и многочисленной популяцией ПК, по сравнению с видами с закрытым типом апикальной меристемы и малочисленной популяцией ПК.

Еще одним фактором, обуславливающим количество ПК, является способность вида растения формировать микоризные ассоциации. Nagahashi и Douds [14] показали, что виды, формирующие микоризные ассоциации, продуцируют значительно большее количество ПК, чем виды, для которых не характерна микоризная колонизация. Многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют, что популяция ПК играет одну из ключевых ролей в системе ризосферного симбиотического сигналинга [8, 15–20].

Численность популяции свободных ПК в условиях физиологической нормы поддерживается на постоянном уровне благодаря многочисленным системам регуляторного сигналинга. В гидропонной культуре проростков гороха посевого показано, что после смыывания свободных ПК, численность их популяции в корневом апексе полностью восстанавливалась в течение 24 ч [21]. Следует отметить, что в течение первых 5 мин после смыывания свободных ПК количество митотических клеток в меристеме резко возрастало и продолжало линейно увеличиваться в течение последующих 30 мин. В течение последующих 5 ч митотическая активность снижалась до контрольного уровня. После смыывания ПК в клетках корневого чехлика наблюдалось увеличение экспрессии генов, кодирующих пектинметилэстеразу, участвующей в процессах отделения ПК от поверхности корневого чехлика, а также ферментов, участвующих в синтезе крахмала – основного источника энергии в ПК после утраты физического контакта с корневым апексом. Но, если корневые апексы после смыывания ПК культивировали на среде с экзометаболитами ПК, активность восстановления популяции ПК резко снижалась [21].

Численность популяции свободных ПК изменяется под воздействием различных абиотических факторов. Показано, что водный дефицит, флуктуации температуры и концентрации кислорода [22, 23], осмотический стресс [7], фториды [24], алюминий [25], пестициды [26], наноразмерные формы гуминовых кислот [27], тяжелые металлы [13] влияют на численность популяции ПК. Во многих работах отмечается, что снижение численности популяции свободных ПК сопровождается развитием фитотоксических эффектов: ингибирование роста корня, развитие окислительного стресса, деструктив-

ные морфологические, физиологические и биохимические изменения корня. Это предполагает важную роль популяции ПК в формировании устойчивости корневой системы к различным абиотическим факторам.

Следует отметить, что влияние абиотических факторов на численность популяции ПК может иметь возрастные особенности. На ранних этапах развития проростков гороха (первые сутки, длина корня до 25 мм) снижение концентрации O_2 приводило к уменьшению численности ПК, на более поздних этапах развития проростка (вторые сутки и старше, длина корня более 25 мм) снижение концентрации O_2 вызывало увеличение численности ПК, по сравнению с контрольными вариантами [28].

Симбиотические, патогенные, паразитические виды одноклеточных и многоклеточных организмов также оказывают влияние на численность популяции ПК. Инокуляция корней гороха посевого афаномицетной корневой гнилью гороха (*Aphanomyces euteiches*) [29], бесполой репродуктивной стадией фузариума пасленового (*Nectria haematococca*) [30], приводило к увеличению количества ПК. Уменьшение численности ПК сопровождается снижением устойчивости к патогенам и нарушением симбиотических взаимодействий.

Изменение численности популяции свободных ПК в физиологических и патофизиологических условиях зависит от пролиферации и дифференцировки меристематических клеток корневого чехлика (калиптрогена) [31], а также процессов отделения дифференцированных ПК от поверхности корневого апекса [5].

В процессе дифференцировки и отделения ПК от корневого апекса гороха клеточные стенки подвергаются многоуровневому ремоделированию, которое связано с локальным растворением участков, обогащенных гомо- и рамногалактуронамом, рамногалактуронамом I и арабином [5]. На заключительном этапе “отрыва” ПК от поверхности апекса наблюдается элонгация и изгибание клеточной стенки – отделяющиеся ПК приобретают дугообразную форму. Эти процессы зависят от экстензина и ксилоглюкана, локализованных в зоне клеточной стенки, которая противоположна той, где происходит отделение. После отделения интактные, относительно тонкие клеточные стенки свободных ПК содержат гомо- и рамногалактуронам и галактановые эпитопы [5].

Ремоделирование клеточных стенок в процессе отделения ПК зависит от определенных ферментов и АФК (неферментативное ремоделирование) [5]. В ферментативном ремоделировании клеточных стенок участвует несколько типов гидролаз: пектинметилэстеразы, полигалактуроназы, галактозидазы и арабинозидазы [32].

Пектинметилэстеразы (ПМЭ) локализируются в клеточной стенке. ПМЭ катализируют деметилэтерификацию гомогалактуронана (основной компонент пектина), высвобождая метанол и протоны, создавая отрицательно заряженные карбоксильные группы. ПМЭ могут деметилэтерифицировать гомогалактуронан блочным способом, что приводит к образованию нескольких последовательных остатков α -1,4-связанной D-галактуроновой кислоты (GalA) без метилэфирных групп. С другой стороны, ПМЭ могут деметилэтерифицировать отдельные остатки GalA, что определяет случайный характер метилэтерификации. Степень и характер метилэтерификации гомогалактуронана определяют биомеханические свойства клеточной стенки и влияют на клеточную адгезию. Частично деметилэтерифицированный гомогалактуронан может стать субстратом для полигалактуроназ (ферментов, участвующих в деградации пектина) [32].

Активность ПМЭ регулируется: на уровне транскрипции; процессингом и деградацией белка; pH среды клеточной стенки; семейством эндогенных белковых ингибиторов ПМЭ [32]. ПМЭ косвенно, за счет снижения pH в клеточной стенке, активируют галактозидазы и арабинозидазы, которые гидролизуют галактозо/арабинозосодержащие боковые цепи рамногалактуронана I. Гидролиз рамногалактуронана I, в дополнение к деметилэтерификации и гидролизу гомогалактуронана, способствует снижению клеточной адгезии ПК [33].

Показано, что ПМЭ может оказывать влияние на активность отделения ПК от поверхности корневого апекса. У гороха ПК отделяются в форме одиночных клеток. У трансгенных растений, у которых заблокирована экспрессия гена ПМЭ, ПК не способны отделяться от поверхности корневого чехлика и диспергироваться в суспензии. ПК формируют на корневом апексе скопления клеток [33].

Участвующие в ремоделировании клеточных стенок полигалактуроназы в зависимости от способа их действия подразделяют на эндо- и экзо-полигалактуроназы. Для работы эндо-полигалактуроназ решающим фактором является характер метилирования цепей гомогалактуронана (деметилэтерификация четырех последовательных GalA-остатков цепи). Эти ферменты гидролизуют гомогалактуронан в случайных местах, вызывая быструю элонгацию клеток и даже их разделение. Экзо-полигалактуроназы атакуют свободные концы деметилэтерифицированных полимеров гомогалактуронана, уменьшая общую длину полимера, что обуславливает медленную элонгацию клеток без их разделения [34].

Наряду с фермент-зависимыми реакциями важную роль в структурном ремоделировании

клеточной стенки играют свободнорадикальные химические модификации гликополимеров [35]. Реакции АФК со структурными элементами клеточной стенки приводят к окислительному расщеплению ксилоглоканов и пектинов, сшивкам полисахаридов, этерификации пектина и гемицеллюлозы, формированию дисульфидных связей в белках [36–38]. АФК-зависимые окислительные модификации увеличивают активность гидролаз, участвующих в процессах ремоделирования клеточных стенок (ПМЭ, полигалактуроназ, арабинозидаз), содержание Ca^{2+} в цитоплазме. В результате деметилэтерификации гомогалактуронана гидролазами образуется большое количество отрицательно заряженных карбоксильных групп, которые с участием Ca^{2+} формируют связи между молекулами пектина. Эти структурные перестройки увеличивают жесткость клеточных стенок и клеточную адгезию [39]. Карбоксильные группы могут формировать связи между молекулами пектина, связываясь с двухвалентными ионами тяжелых металлов. Эти взаимодействия определяют иммобилизацию тяжелых металлов в клеточных стенках и снижают их цитотоксичность [38]. Ферментативное и АФК-зависимое ремоделирование клеточной стенки играет ключевую роль в процессах адаптации растительных организмов к тяжелым металлам.

МЕТАБОЛОМ ПОГРАНИЧНЫХ КЛЕТОК

Популяция ПК характеризуется уникальными паттернами экспрессии генов. Некоторые гены экспрессируются исключительно в ПК:

- *Brd13*, точная функция белка, который кодируется этим геном, не известна, но наличие флавин-связывающего домена предполагает его участие в регуляции флавиномононуклеотид-опосредованных окислительно-восстановительных реакций [40];

- *BRDgal1* кодирует фермент β -галактозидазу, участвующую в процессах ремоделирования клеточных стенок [41].

Однако, несмотря на экспрессию этих генов исключительно в ПК, их дефицит у трансгенных растений приводит к аномалиям морфогенеза корня (дефицит гена *Brd13* [40]), либо исключает возможность получения жизнеспособных трансгенных растений (ген β -галактозидазы [41]).

Сравнительный анализ транскриптомов ПК и клеток апикальной меристемы корня, позволил выявить группу генов, активность экспрессии которых значительно выше в ПК, чем в меристеме:

- ген ингибитора ПМЭ, негативный регулятор активности ПМЭ; уровень экспрессии ингибитора повышается в отделившихся ПК,

после завершения процессов ремоделирования клеточных стенок [42];

- гены раннего ответа на ауксин (семейство генов SAUR), негативные регуляторы синтеза и транспорта ауксина, гормона, который увеличивает активность пролиферации клеток корневой меристемы [42];

- гены, связанные с метаболизмом крахмала (крахмал – основной источник энергии в ПК после отделения от корневого апекса [42].

Уникальные паттерны экспрессии генов определяют существенные отличия метаболома ПК от других клеточных популяций корня. Количественный и качественные спектры гликополимеров (пектины, гемицеллюлозы, арабиногалактановые белки) клеточных стенок ПК существенно отличаются от спектров гликополимеров клеток меристемы корневого апекса и клеток зоны элонгации [7]. Транскриптомный анализ ПК выявил высокий уровень экспрессии генов, связанных с метаболизмом фенолпропаноидов, флавоноидов, терпеноидов, лигнинов и лигнанов [42]. Характерная для ПК высокая активность синтеза вторичных метаболитов, участвующих в регуляции взаимоотношений с патогенными, паразитическими и симбиотическими видами одноклеточных и многоклеточных организмов, позволяет рассматривать ПК как важнейший элемент иммунной системы корня [16].

СЕКРЕТОМ ПОГРАНИЧНЫХ КЛЕТОК. КОРНЕВАЯ ЭКСТРАКЛЕТОЧНАЯ ЛОВУШКА

Характерной особенностью физиологии ПК является высокая активность секреции. В ПК выявляется гипертрофированный аппарат Гольджи и многочисленные везикулы как свидетельство активной секреции [43]. Секретом ПК представлен многочисленными продуктами первичного и вторичного метаболизма: различными белками (ферменты, арабиногалактановые белки, гистоны), ДНК, пектиновыми полисахаридами, флавоноидами, полифенолами, органическими и неорганическими кислотами [10, 44, 45]. Секретом ПК – динамичная система: количественные и качественные спектры экзометаболитов ПК значительно варьируют под воздействием различных биотических/абиотических факторов [46]. Многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют, что индуцированные различными факторами перестройки секрета ПК носят адаптивный характер и способствуют формированию резистентных корневых фенотипов [47].

Экзометаболиты ПК формируют вокруг корневого апекса физическую субстанцию, гелевый чехол, который в гидропонных культу-

рах сохраняет свою структурную целостность в форме гелевой капли на корневом апексе. Матрикс гелевого чехла включает свободные ПК, удерживая их вблизи корневого апекса после утраты физического контакта с поверхностью корневого чехлика. В настоящее время гелевый чехол, сформированный из экзометаболитов ПК, рассматривается как высокоэффективная функциональная система – корневая экстраклеточная ловушка (root extracellular trap, RET) [48]. Экзометаболиты различных химических классов определяют многофункциональность RET: способность “захватывать” экотоксиканты различных химических классов (тяжелые металлы, пестициды, техногенные полиароматические углеводороды, наночастицы); привлекать корневых симбионтов (арбускулярные микоризные грибы, азотфиксирующие ризобактерии) и различные виды бактерий, формирующих динамичный ризосферный микробиом [49]; снижать активность инвазии различных корневых патогенов (вирусов, простейших, грибов, нематод, растений); удерживать воду в матриксе RET; включаться в процессы модификации физико-химических свойств почвы и увеличивать доступность почвенных нутриентов [44].

Защитная эффективность RET в отношении фитотоксичных металлов связана с деметилэтерифицированным пектином. Клеточные стенки ПК содержат значительные количества пектиновых полисахаридов гомогалактуронанов и ксилогалактуронанов. В процессе ремоделирования клеточных стенок ПК пектиновые полисахариды освобождаются в экстраклеточную среду и включаются в матрикс RET [47]. Пектин – гликополимер с многочисленными гидрофильными функциональными группами (гидроксильные и карбоксильные группы, ациламиногруппы). Электростатическое взаимодействие катионов металлов с гидроксильными и карбоксильными группами пектина [50] способствует иммобилизации металлов в матриксе RET и снижает активность их проникновения в корневые меристемы. Показано, что стратегия адаптации к фитотоксическим концентрациям алюминия [51] и железа [52] связана с увеличением активности секреции деметилэтерифицированного пектина ПК. Функциональные группы пектина [53] участвуют и в иммобилизации наночастиц металлов в матриксе RET [54].

В иммобилизации металлов в матриксе RET наряду с пектином важную роль играет экстраклеточная ДНК (эксДНК) [55]. Wen и соавт. [56] инкубировали корни проростков гороха на среде с ^{32}P -dЦТФ и через 1 ч обнаружили в составе RET ^{32}P -меченую эксДНК, синтезированную *de novo*. На основе полученных результатов авторы пришли к заключению, что эксДНК включается в матрикс RET как продукт активной секреции

ПК и не связана с деградацией мертвых клеток. С помощью методов геномного секвенирования было показано, что эксДНК в матриксе RET имеет митохондриальное происхождение [57]. Особенности химической структуры ДНК определяют взаимодействие этого полимера с ионами металлов. ДНК как полианион связывает ионы металлов через электростатические взаимодействия, азотистые основания вступают в координационные взаимодействия с ионами металлов [58]. Небольшие молекулы с плоскими ароматическими группами, например, гербициды, могут связываться с ДНК за счет интеркаляции между азотистыми основаниями (π - π -стекинг-взаимодействия) [59]. Это позволяет предполагать, что иммобилизация ионов металлов, наночастиц металлов, агропестицидов в матриксе RET за счет взаимодействия с эксДНК может быть одним из важнейших механизмов формирования устойчивости к этим агентам.

Стратегия адаптации к фитотоксическим концентрациям металлов и наночастицам металлов включает не только их иммобилизацию в матриксе RET, но и связывание с клеточными стенками ПК и внутриклеточное депонирование в ПК. Так, для катионов алюминия, наночастиц серебра и наночастиц сульфида серебра была показана сорбция на клеточных стенках ПК. Концентрация алюминия и серебра в ПК была значительно выше, чем в других клетках корневого апекса [60].

Активность внутриклеточного депонирования наночастиц в ПК зависит от поверхностного заряда наночастиц и структурных особенностей клеточной стенки. Так, в свободных ПК, утративших контакт с корневым апексом, избирательно депонировались положительно и отрицательно заряженные наночастицы золота. В ПК, еще не утративших физического контакта с корневым апексом (другой уровень клеточной дифференцировки), положительно заряженные наночастицы золота не проникали, но индуцировали секрецию экзометаболических ферментов, которые эффективно иммобилизовали эти наночастицы в матриксе RET и предотвращали их проникновение в корневой апекс. Иммобилизация отрицательно заряженных частиц золота в матриксе RET не наблюдалась, эти частицы активно проникали в клетки корневого чехлика [60].

Метаболиты различных почвенных патогенов индуцируют адаптивные перестройки состава матрикса RET: в ПК активируется синтез и секреция различных метаболитов, которые влияют на физиологию почвенных патогенов, снижая активность их инвазии в корневой апекс. Количественные и качественные спектры экзометаболических ферментов, их функциональный репертуар варьируют в зависимости от вида патогена.

Так, у люцерны (*Medicago truncatula*) экзо-метаболит ПК 7,4-дигидроксифлавонол ингибирует рост почвенного микопатогена тexasской корневой гнили (*Phymatotrichopsis omnivora*) [42]. Арабиногалактановые белки в составе матрикса RET гороха ингибируют прорастание зооспор патогенного оомицета *Aphanomyces euteiches* и способствуют их инцистированию [46].

Секретируемые ПК хемоаттрактанты способствуют сорбции бактерий и зооспор на клеточной стенке ПК, что в результате снижает эффективность их проникновения в меристему корневого апекса [11]. В качестве хемоаттрактантов могут выступать производные гликополимеров клеточной стенки (рамногалактуронаны и арабиногалактановые белки) [61].

Гидролитические ферменты в составе экзо-метаболитов ПК реализуют свою защитную активность через нарушение структурной целостности клеточной стенки патогенов. Секретируемые ПК хитиназы разрушают основной гликополимер клеточной стенки микопатогенов [62], β -глюконазы гидролизуют β -глюканы бактериальных стенок [63].

Важную роль в защитной эффективности RET играют АФК. Бактериальные (флагеллин и пептидогликаны) и фунгальные (хитин и фузариовая кислота) метаболиты увеличивают в ПК активность продукции АФК, которые диффундируют в матрикс RET и инициируют деструктивные окислительные модификации в клетках фитопатогенов [6].

Наряду с количественными и качественными перестройками состава экзо-метаболитов защитная эффективность RET зависит от физической вязкости матрикса. В присутствии патогенов увеличивается секреция гликополимеров и эксДНК, которые увеличивают вязкость матрикса RET и способствуют физической иммобилизации зооспор и бактериальных клеток в RET. Для повышения эффективности инвазии патогены секретируют ДНК-азы и пектин-деградирующие ферменты, снижающие физическую вязкость матрикса RET [64]. Для защиты от микопатогенов, секретирующих пектин-деградирующие ферменты (*Phytophthora infestans*, *Pseudomonas syringae*), в матриксе RET увеличивается количество ксилгалактуронанов и гликополимеров с более высокой устойчивостью к ферментативной деградации [65].

Среди экзо-метаболитов ПК, обладающих антибактериальной активностью, следует отметить гистон H4, единственный тип коровых гистонов, который выявляется в матриксе RET [30]. Предполагается, что антибактериальная активность гистона H4 может реализоваться двумя способами: гистон H4 способствует связыванию бактериальных клеток с эксДНК, после чего бактерии подвергаются воздействию антибактериальных

агентов, входящих в состав RET [66]; непосредственное взаимодействие гистона H4 с клетками бактерий и нарушение структурно-функциональной целостности бактериальных мембран [66]. Антибактериальная активность гистона H4 была выявлена в отношении корневого фитопатогена *Ralstonia solanacearum* [66].

В настоящее время RET у растений рассматривается как один из вариантов эволюционно консервативных высокоэффективных ДНК-содержащих экстраклеточных ловушек, защищающих от патогенной инвазии многоклеточные организмы и простейших [67]. У млекопитающих антибактериальный арсенал нейтрофилов дополняют нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET) – экстраклеточная молекулярная система, которая ограничивает диссеминацию патогенов и вызывает их гибель. Матрикс NET формируется из ДНК, ядерного или митохондриального происхождения, и включает цитозольные и ядерные белки (гистоны). Бактерии, вирусы, микопатогены иммобилизируются в матриксе NET [68]. Впервые NET были описаны в 2004 г. Brinkmann и соавт. [69]. У млекопитающих подобные экстраклеточные ловушки способны формировать моноциты, эозинофилы, тучные клетки, у птиц – гетерофилы, у членистоногих и моллюсков – гемоциты [70, 71]. Внеклеточные ловушки описаны у социальных амёб рода *Dictyostelium*. Специализированные S-клетки формируют ДНК-содержащие экстраклеточные ловушки, в которых происходит иммобилизация бактерий [72].

Таким образом, ПК – метаболически активная клеточная популяция, теряющая в процессе дифференцировки механический контакт с поверхностью корневого апекса. Отделившиеся от поверхности корневого апекса ПК играют ключевую роль в формировании функционального репертуара растения и в структурно-функциональной организации ризосферы. Значимость ПК для ризосферной экосистемы в значительной степени определяется их секреторной активностью. С экзометаболитами ПК связано формирование ризосферного микробиома и колонизация корневой системы симбиотическими видами грибов и бактерий. Эффективность корневой иммунной системы зависит от экзометаболитов ПК. Сформированные из экзометаболитов ПК корневые экстраклеточные ловушки иммобилизируют в своем матриксе зооспоры и клетки патогенов, снижая активность патогенной инвазии корневой меристемы. Химическое разнообразие экзометаболитов определяет возможность иммобилизации в матриксе RET различных экотоксинов (тяжелых металлов, наночастиц, агропестицидов) и снижение уровня токсических эффектов в апикальной меристеме. В дополнении к RET в иммобилизацию экоток-

синов включаются ПК: экотоксины депонируются в их клеточной стенке и внутриклеточно.

Ключевая роль ПК и их секретотома в процессах адаптации к абиотическим факторам, в реакциях иммунной системы корня, в межвидовом коммуникативном сигналинге определяют исключительную значимость системы ПК-RET для поддержания гомеостаза ризосферных экосистем. Высокий уровень структурно-функциональной пластичности системы ПК-RET позволяет рассматривать ее как перспективную молекулярно-клеточную мишень в технологиях ризосферного инжиниринга.

Адаптивная пластичность системы ПК-RET позволяет рассматривать ее как перспективную функциональную мишень для агропрайминга. Предварительная индукция прайминг-агентами адаптивных перестроек, связанных с увеличением продукции ПК с повышенной секреторной активностью и формированием развитого матрикса RET, будет поддерживать резистентность корневой системы к последующему воздействию различных стресс-факторов. Такой прайминг будет эффективен в отношении поллютантов, у которых проявление токсических эффектов в корневой системе зависит от количественного и качественного спектра корневых экзометаболитов (например, тяжелые металлы и в частности медь) [73, 74]. Актуальность прайминга, нацеленного на формирование резистентных корневых фенотипов, обусловлена использованием в современных агротехнологиях неочищенных или частично очищенных сточных вод с высоким содержанием фитотоксикантов для ирригации [75].

Еще одно потенциальное “практическое” приложение пластичности системы ПК-RET – экологический мониторинг. В гидропонной культуре численность ПК значительно варьирует у проростков, полученных из семян урожая разных лет [11]. Причиной вариабельности являются уникальные условия среды, на фоне которых в определенные годы происходит развитие культурных растений, семена которых используют для проращивания в лабораторных условиях. Лабораторные исследования “ежегодной” вариабельности численности популяции ПК, их секреторной активности позволят выделить паттерны факторов среды, которые способны оказывать влияние на фенотип системы ПК-RET у растений следующего урожая. Активность продукции ПК у проростков может быть прогностическим маркером устойчивости растений будущего урожая к корневым патогенам или водному дефициту. Лабораторный мониторинг вариабельности численности ПК у дикорастущих видов может быть полезен для разработки алгоритмов прогнозирования развития ризосферных экосистем природных растительных сообществ.

Развитие представлений о роли системы ПК-RET в ризосферных экосистемах в значительной степени связано с использованием гидропонных культур. Однако изучение системы ПК-RET в гидропонных культурах имеет “самостоятельную” актуальность в связи с активным развитием технологий гидропонного сельского хозяйства. По прогнозам, в 2029 г. размер рынка продуктов гидропонного сельского хозяйства достигнет 7.6 млрд. долларов США [76]. Контролируемые адаптивные перестройки системы ПК-RET могут стать основой высокопроизводительного гидропонного производства (не только на Земле, но и в условиях длительных космических перелетов).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hawes M.C., Gunawardena U., Miyasaka S., Zhao X. The role of root border cells in plant defense // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 128. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01556-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01556-9)
2. Knudson L. Viability of detached root-cap cells // Am. J. Bot. 1919. V. 6. P. 309.
3. Hawes M.C., Lin H.J. Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*) // Plant Physiol. 1990. V. 94. P. 1855. <https://doi.org/10.1104/pp.94.4.1855>
4. Hawes M.C., Pueppke S.G. Sloughed peripheral root cap cells: yield from different species and callus formation from single cells // Am. J. Bot. 1986. V. 73. P. 1466. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1986.tb10892.x>
5. Mravec J., Guo X., Hansen A.R., Schückerl J., Kračun S.K.I., Mikkelsen M.D., Mouille G., Johansen I.E., Ulvskov P., Domozych D.S., Willats W.G.T. Pea border cell maturation and release involve complex cell wall structural dynamics // Plant Physiol. 2017. V. 174. P. 1051. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00097>
6. Plancot B., Santaella C., Jaber R., Kiefer-Meyer M.C., Follet-Gueye M.L., Leprince J., Gattin I., Souc C., Driouich A., Vitré-Gibouin M. Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis* and flax to pathogen-derived elicitors // Plant Physiol. 2013. V. 163. P. 1584. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222356>
7. Busont O., Durambur G., Bernard S., Plasson C., Joudiou C., Baude L., Chefdor F., Depierreux C., Héricourt F., Larcher M., Malik S., Boulogne I., Driouich A., Carpin S., Lamblin F. Black poplar (*Populus nigra* L.) root extracellular trap, structural and molecular remodeling in response to osmotic stress // Cells. 2023. V. 12. P. 858. <https://doi.org/10.3390/cells12060858>
8. Vitré M., Santaella C., Blanchet S., Gateau A., Driouich A. Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 998. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051813>
9. Endo I., Tange T., Osawa H. A cell-type-specific defect in border cell formation in the *Acacia mangium* root cap developing an extraordinary sheath of sloughed-off cells // Ann. Bot. 2011. V. 108. P. 279. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr139>
10. Ropitiaux M., Bernard S., Schapman D., Follet-Gueye M.L., Vitré M., Boulogne I., Driouich A. Root border cells and mucilage secretions of soybean, *Glycine max* (Merr) L.: characterization and role in interactions with the oomycete *Phytophthora parasitica* // Cells. 2020. V. 9. P. 2215. <https://doi.org/10.3390/cells9102215>
11. Curlango-Rivera G., Huskey D.A., Mostafa A., Kessler J.O., Xiong Z., Hawes M.C. Intraspecific variation in cotton border cell production: rhizosphere microbiome implications // Am. J. Bot. 2013. V. 100. P. 1706. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200607>
12. Hawes M.C., Bengough G., Cassab G., Ponce G. Root caps and rhizosphere // J. Plant Growth Regul. 2002. V. 21. P. 352. <https://doi.org/10.1007/s00344-002-0035-y>
13. Feng Y., Li H., Zhang X., Li X., Zhang J., Shi L., Chen X., Nong W., Wang C., Shabala S., Yu M. Effects of cadmium stress on root and root border cells of some vegetable species with different types of root meristem // Life. 2022. V. 12. P. 1401. <https://doi.org/10.3390/life12091401>
14. Nagahashi G., Douds D.D. Isolated root caps, border cells, and mucilage from host roots stimulate hyphal branching of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora gigantea* // Mycol. Res. 2004. V. 108. P. 1079. <https://doi.org/10.1017/S0953756204000693>
15. Berry A.M., Rasmussen U., Bateman K., Huss-Danell K., Lindwall S., Bergman B. Arabinogalactan proteins are expressed at the symbiotic interface in root nodules of *Alnus* spp // New Phytol. 2002. V. 155. P. 469. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00466.x>
16. Watson B.S., Bedair M.F., Urbanczyk-Wochniak E., Huhman D.V., Yang D.S., Allen S.N., Li W., Tang Y., Sumner L.W. Integrated metabolomics and transcriptomics reveal enhanced specialized metabolism in *Medicago truncatula* root border cells // Plant Physiol. 2015. V. 167. P. 1699. <https://doi.org/10.1104/pp.114.253054>
17. Canellas L.P., Olivares F.L. Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid // Plant Soil. 2017. V. 417. P. 403. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3267-0>

18. Hassan M.K., McInroy J.A., Klopper J.W. The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review // *Agriculture*. 2019. V. 9. P. 142.
<https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>
19. Shirakawa M., Matsushita N., Fukuda K. Visualization of root extracellular traps in an ectomycorrhizal woody plant (*Pinus densiflora*) and their interactions with root-associated bacteria // *Planta*. 2023. V. 258. P. 112.
<https://doi.org/10.1007/s00425-023-04274-1>
20. Ragland C.J., Shih K.Y., Dinneny J.R. Choreographing root architecture and rhizosphere interactions through synthetic biology // *Nat. Commun.* 2024. V. 15. P. 1370.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-45272-5>
21. Brigham L.A., Woo H.H., Wen F., Hawes M.C. Meristem-specific suppression of mitosis and a global switch in gene expression in the root cap of pea by endogenous signals // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. P. 1223.
<https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1223>
22. Bojun M., Jianwei P., Zhaojuan F., Pinghua Z., Muyuan Z. Development and influencing factors of soybean root border cell // *Zuowu Xuebao*. 2005. V. 31. P. 165.
23. Kumar N., Iyer-Pascuzzi A.S. Shedding the last layer: mechanisms of root cap cell release // *Plants*. 2020. V. 9. P. 308.
<https://doi.org/10.3390/plants9030308>
24. Bozhkov A.I., Kuznetsova Y.A., Menzhanova N.G. Effect of sodium fluoride on the root apex border cells in one-day-old wheat seedlings // *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 480.
<https://doi.org/10.1134/S1021443709040062>
25. Xiao Z., Liang Y. Silicon prevents aluminum from entering root tip by promoting formation of root border cells in rice // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 175. P. 12.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.003>
26. Shishatskaya E., Menzhanova N., Zhila N., Prudnikova S., Volova T., Thomas S. Toxic effects of the fungicide tebuconazole on the root system of fusarium-infected wheat plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 132. P. 400.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.025>
27. Menzhanova N.G., Pyatina S.A., Shabanov A.V., Shishatskaya E.I. Dose-dependent effects of nanoscale forms of humic acids in a hydroponic culture of *Triticum aestivum*: induction of oxidative stress and an increase in the number of border cells // *J. Sib. Fed. Univ. Biol.* 2023. V. 16. P. 64.
28. Zhao X., Misaghi I.J., Hawes M.C. Stimulation of border cell production in response to increased carbon dioxide levels // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 181.
<https://doi.org/10.1104/pp.122.1.181>
29. Cannesan M.A., Gangneux C., Lanoue A., Giron D., Laval K., Hawes M., Driouich A., Vicré-Gibouin M. Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches* // *Ann. Bot.* 2011. V. 108. P. 459.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcr177>
30. Wen F., VanEtten H.D., Tsaprailis G., Hawes M.C. Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. P. 773.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.091637>
31. Woo H.H., Hirsch A.M., Hawes M.C. Altered susceptibility to infection by *Sinorhizobium meliloti* and *Nectria haematococca* in alfalfa roots with altered cell cycle // *Plant Cell Rep.* 2004. V. 22. P. 967.
<https://doi.org/10.1007/s00299-004-0787-x>
32. Wormit A., Usadel B. The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs) // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 2878.
<https://doi.org/10.3390/ijms19102878>
33. Driouich A., Durand C., Vicré-Gibouin M. Formation and separation of root border cells // *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. P. 14.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.003>
34. Babu Y., Bayer M. Plant polygalacturonases involved in cell elongation and separation – the same but different? // *Plants*. 2014. V. 3. P. 613.
<https://doi.org/10.3390/plants3040613>
35. Yan J., Zhu J., Zhou J., Xing C., Song H., Wu K., Cai M. Using brefeldin A to disrupt cell wall polysaccharide components in rice and nitric oxide to modify cell wall structure to change aluminum tolerance // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 948212.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.948212>
36. Schmidt R., Kunkowska A.B., Schippers J.H. Role of reactive oxygen species during cell expansion in leaves // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 2098.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.00426>
37. Majda M., Robert S. The role of auxin in cell wall expansion // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 951.
<https://doi.org/10.3390/ijms19040951>
38. Zhang J., Qian Y., Chen Z., Ameer M., Niu H., Du D., Yao J., Chen K., Chen L., Sun J. Lead-induced oxidative stress triggers root cell wall remodeling and increases lead absorption through esterification of cell wall polysaccharide // *J. Hazard. Mater.* 2020. V. 385. P. 121524.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121524>
39. Pieczywek P.M., Leszczuk A., Kurzyńska-Szklarek M., Cybulska J., Jóźwiak Z., Rutkowski K., Zdunek A. Apple metabolism under oxidative stress affects plant cell wall structure and mechanical properties // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. P. 13879.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-40782-6>
40. Wen F., Brigham L.A., Curlango-Rivera G., Xiong Z., Hawes M.C. Altered growth and root tip morphology in *Pisum sativum* L. in response to altered expression of a gene expressed in border cells // *Plant Soil.* 2014. V. 377. P. 179.
<https://doi.org/10.1007/s11104-013-1995-3>
41. Wen F., Celoy R., Price I., Ebolo J.J., Hawes M.C. Identification and characterization of a rhizosphere β -galactosidase from *Pisum sativum* L. // *Plant Soil.* 2008. V. 304. P. 133.
<https://doi.org/10.1007/s11104-007-9528-6>
42. Chuberre C., Plancot B., Driouich A., Moore J.P., Bardor M., Gügi B., Vicré M. Plant immunity is compart-

- mentalized and specialized in roots // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1692.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01692>
43. *Driouich A., Gaudry A., Pawlak B., Moore J.P.* Root cap – derived cells and mucilage: a protective network at the root tip // *Protoplasma.* 2021. V. 258. P. 1179.
<https://doi.org/10.1007/s00709-021-01660-y>
 44. *Hawes M., Allen C., Turgeon B.G., Curlango-Rivera G., Minh Tran T., Huskey D.A., Xiong Z.* Root border cells and their role in plant defense // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016. V. 54. P. 143.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100140>
 45. *Driouich A., Smith C., Ropitiaux M., Chambard M., Boulogne I., Bernard S., Follet-Gueye M., Viché M., Moore J.* Root extracellular traps versus neutrophil extracellular traps in host defence, a case of functional convergence? // *Biol. Rev.* 2019. V. 94. P. 1685.
<https://doi.org/10.1111/brv.12522>
 46. *Driouich A., Follet-Gueye M.L., Viché-Gibouin M., Hawes M.* Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2013. V. 16. P. 489.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.010>
 47. *Carreras A., Bernard S., Durambur G., Gügi B., Loutelier C., Pawlak B., Boulogne I., Viché M., Driouich A., Goffner D., Follet-Gueye M.L.* *In vitro* characterization of root extracellular trap and exudates of three *Sahe-lian* woody plant species // *Planta.* 2020. V. 251. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03302-3>
 48. *Vincent D., Raftiqi M., Job D.* The multiple facets of plant–fungal interactions revealed through plant and fungal secretomics // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 10. P. 1626.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01626>
 49. *Hartman K., Schmid M.W., Bodenhausen N., Bender S.F., Valzano-Held A.Y., Schlaeppi K., van der Heijden M.G.* A symbiotic footprint in the plant root microbiome // *Environ. Microbiome.* 2023. V. 18. P. 65.
<https://doi.org/10.1186/s40793-023-00521-w>
 50. *Li J., Yang Z.L., Ding T., Song Y.J., Li H.C., Li D.Q., Chen S., Xu F.* The role of surface functional groups of pectin and pectin-based materials on the adsorption of heavy metal ions and dyes // *Carbohydr. Polym.* 2022. V. 276. P. 118789.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118789>
 51. *Nagayama T., Nakamura A., Yamaji N., Satoh S., Furukawa J., Iwai H.* Changes in the distribution of pectin in root border cells under aluminum stress // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1216.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01216>
 52. *Zhang Y., Wu Y., Xu G., Song J., Wu T., Mei X., Liu P.* Effects of iron toxicity on the morphological and biological characteristics of rice root border cells // *J. Plant Nutr.* 2017. V. 40. P. 332.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1240193>
 53. *Dolinska J., Holdynski M., Pieta P., Lisowski W., Ratajczyk T., Palys B., Jablonska A., Opalło M.* Noble metal nanoparticles in pectin matrix. Preparation, film formation, property analysis, and application in electrocatalysis // *ACS Omega.* 2020. V. 5. P. 23909.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03167>
 54. *Feng L., Xu N., Qu Q., Zhang Z., Ke M., Lu T., Qian H.* Synergetic toxicity of silver nanoparticle and glyphosate on wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 797. P. 149200.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149200>
 55. *Park H.J., Wang W., Curlango-Rivera G., Xiong Z., Lin Z., Huskey D.A., Hawes M.C., VanEtten H.D., Turgeon B.G.* A DNase from a fungal phytopathogen is a virulence factor likely deployed as counter defense against host-secreted extracellular DNA // *MBio.* 2019. V. 10. P. 10.
<https://doi.org/10.1128/mbio.02805-18>
 56. *Wen F., White G.J., VanEtten H.D., Xiong Z., Hawes M.C.* Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 820.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.142067>
 57. *Chambard M., Plasson C., Derambure C., Coutant S., Tournier I., Lefranc B., Leprince J., Kiefer-Meyer M.C., Driouich A., Follet-Gueye M.L., Boulogne I.* New insights into plant extracellular DNA. A study in soybean root extracellular trap // *Cells.* 2021. V. 10. P. 69.
<https://doi.org/10.3390/cells10010069>
 58. *Zhou W., Saran R., Liu J.* Metal sensing by DNA // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 8272.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00063>
 59. *Karimi-Maleh H., Liu Y., Li Z., Darabi R., Orooji Y., Karaman C., Karimi F., Baghayeri M., Rouhi J., Fu L., Rostamnia S., Rajendran S., Sanati A.L., Sadeghifar H., Ghalkhani M.* Calf thymus ds-DNA intercalation with pendimethalin herbicide at the surface of ZIF-8/Co/rGO/C3N4/ds-DNA/SPCE; a bio-sensing approach for pendimethalin quantification confirmed by molecular docking study // *Chemosphere.* 2023. V. 332. P. 138815.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138815>
 60. *Avellan A., Yun J., Zhang Y., Spielman-Sun E., Unrine J.M., Thieme J., Li J., Lombi E., Bland G., Lowry G.V.* Nanoparticle size and coating chemistry control foliar uptake pathways, translocation, and leaf-to-rhizosphere transport in wheat // *ACS Nano.* 2019. V. 13. P. 5291.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09781>
 61. *Oota M., Toyoda S., Kotake T., Wada N., Hashiguchi M., Akashi R., Ishikawa H., B. Favery, Tsai A.Y., Sawa S.* Rhamnogalacturonan-I as a nematode chemoattractant from *Lotus corniculatus* L. super-growing root culture // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 13. P. 1008725.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1008725>
 62. *Vaghela B., Vashi R., Rajput K., Joshi R.* Plant chitinases and their role in plant defense: a comprehensive review // *Enzyme Microb. Technol.* 2022. V. 159. P. 110055.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110055>
 63. *Perrot T., Pauly M., Ramírez V.* Emerging roles of β -glucanases in plant development and adaptive responses // *Plants.* 2022. V. 11. P. 1119.
<https://doi.org/10.3390/plants11091119>

64. *du Toit A.* Defence and counter defence // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. P. 267.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0185-6>
65. *Jensen J.K., Sørensen S.O., Harholt J., Geshi N., Sakuragi Y., Møller I., J. Zandleven, Bernal A.J., Jensen N.B., Sørensen C., Pauly M., Beldman G., Willats W.G.T., Scheller H.V.* Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 1289.
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.050906>
66. *Tran T.M., MacIntyre A., Hawes M., Allen C.* Escaping underground nets: extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. P. e1005686.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005686>
67. *Ramos-Martínez E., Hernández-González L., Ramos-Martínez I., Perez-Campos Mayoral L., López-Cortés G.I., Pérez-Campos E., Andrade G.M., Hernández-Huerta M.T., José M.V.* Multiple origins of extracellular DNA traps // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 621311.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.621311>
68. *Mutua V., Gershwin L.J.* A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: potential anti-NETs therapeutics // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2021. V. 61. P. 194.
<https://doi.org/10.1007/s12016-020-08804-7>
69. *Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science.* 2004. V. 303. P. 1532.
<https://doi.org/10.1126/science.1092>
70. *Reichel M., Muñoz-Caro T., Contreras G.S., García A.R., Magdowski G., Gärtner U., Taubert A., Hermosilla C.* Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* // *Dev. Comp. Immunol.* 2015. V. 50. P. 106.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.02.002>
71. *Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M., Liu Y., Zhao Y., Herrmann M.* New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation // *Front. Immunol.* 2016. V. 7. P. 302.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00302>
72. *Zhang X., Zhuchenko O., Kuspa A., Soldati T.* Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10938.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10938>
73. *Wiszniewska A.* Priming strategies for benefiting plant performance under toxic trace metal exposure // *Plants.* 2021. V. 10. P. 623.
<https://doi.org/10.3390/plants10040623>
74. *Chen H.H., Chen X.F., Zheng Z.C., Huang W.L., Guo J., Yang L.T., Chen L.S.* Characterization of copper-induced-release of exudates by *Citrus sinensis* roots and their possible roles in copper-tolerance // *Chemosphere.* 2022. V. 308. P. 136348.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136348>
75. *Slobodiuk S., Niven C., Arthur G., Thakur S., Ercumen A.* Does irrigation with treated and untreated wastewater increase antimicrobial resistance in soil and water: a systematic review // *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021. V. 18. P. 11046.
<https://doi.org/10.3390/ijerph182111046>
76. Mordor Intelligence (2024)
<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/hydroponics-market>. Cited 6 May 2024.

УДК 581.1,57.047

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *Bacillus velezensis* M66 НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ПРИ РАЗВИТИИ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary¹

© 2024 г. А. В. Сорокань^{а,*}, В. Ф. Габдрахманова^а, И. С. Марданшин^б, И. В. Максимов^а

^аИнститут биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра

Российской академии наук, Уфа, Россия

^бБашкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: fourtyanns@googlemail.com

Поступила в редакцию 07.03.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Изучено влияние штамма бактерий *Bacillus velezensis* M66 на устойчивость растений картофеля к оомицету *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary., вызывающему фитофтороз. Впервые показано накопление числа эндофитных бактерий *B. velezensis* M66 во внутренних тканях растений после инфицирования возбудителем болезни в сравнении с растениями, инокулированными только бактериями. Выявлено значительное сокращение площади поражения фитофторозом вне зависимости от агрессивности используемого штамма патогена. Формирование устойчивости растений под влиянием клеток *B. velezensis* M66 сопровождалось активацией ингибитора трипсина и пероксидаз, накоплением пероксида водорода и транскриптов генов, кодирующих ингибиторы протеиназ, β -1,3-глюканазу и анионную пероксидазу, а так же снижением уровня транскриптов гена *PR1* – маркера развития салицилат-зависимых реакций. По отношению к системе РНК-интерференции было выявлено, что агрессивный штамм *P. infestans* Sn стимулировал в растениях картофеля накопление транскриптов только гена, кодирующего Disc-подобный белок (DCL), а менее агрессивный *P. infestans* 1840 – генов *DCL* и *Ago4*. Обработка растений бактериями *B. velezensis* M66 способствовала накоплению транскриптов гена *Ago1* как в здоровых, так и в инфицированных растениях. Инокуляция растений бактериями и последующее инфицирование оомицетом способствовало накоплению транскриптов всех исследованных генов системы РНК-интерференции. Можно полагать, что инокуляция растений клетками эндофитных бактерий штамма *B. velezensis* M66 способствует формированию устойчивости растений картофеля в отношении оомицета *P. infestans* посредством эффективного праймирования фитоиммунного потенциала.

Ключевые слова: *Bacillus velezensis*, *Phytophthora infestans*, картофель, про-/антиоксидантная система, РНК-интерференция, эндофиты, фитоиммунитет

DOI: 10.31857/S0015330324040039, EDN: MODMNQ

ВВЕДЕНИЕ

Совокупность микроорганизмов, ассоциированных с растением – микробиом – важный фактор модификации фенотипа растения-хозяина, обеспечивающий вариативность всей

системы макро- и микроорганизмов, на которую действуют факторы естественного отбора. Эндофитные микроорганизмы принимают активное участие в метаболизме растений [1, 2]. Вместе с тем, исследование трехстороннего взаимодействия между эндофитами, патогенами и растением является сложной, но тем не менее приоритетной задачей для понимания экологии сложных биосистем. Например, действие таких бактерий на устойчивость растений может быть

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324040039

Сокращения: ЖК – жасмоновая кислота; РНКи – РНК-интерференция; СК – салициловая кислота.

основано не только на антибиотическом действии их метаболитов на патогенов, но и на стимуляции защитных механизмов растений [1–3].

Одним из наиболее распространенных типов культивируемых эндофитных бактерий, обнаруженных в различных растениях, являются бактерии рода *Bacillus*, к которым относятся наиболее известные агенты биологического контроля – ассоциированные с растениями штаммы *B. thuringiensis*, *B. subtilis* и *B. velezensis* [1]. Так, эндофитный штамм *B. velezensis* FQ-G3 продемонстрировал превосходную ингибирующую активность в отношении *Botrytis cinerea*, а плоды томатов, инокулированные этим штаммом, были меньше подвержены серой гнили [2]. Выделенный из побегов риса штамм *B. velezensis* J17-4 обладал значительным антагонистическим эффектом против патогена *Dickeya zeae* [4]. Важно, что выделенный из растений оливы штамм *B. velezensis* OEE1 проявлял антагонизм против оомицетов *Phytophthora ramorum*, *P. cryptogea*, *P. plurivora* благодаря биосинтезу спектра антибиотических соединений [5]. Неоднократно показана их способность индуцировать устойчивость растений к различным патогенам, в том числе возбудителю фитофтороза, наиболее экономически значимой болезни картофеля – оомицету *P. infestans* (Mont.) de Bary [6, 7]. Этот процесс опосредован праймированием защитных PR-генов с вовлечением фитогормонов, таких как жасмоновая (ЖК) и салициловая (СК) кислоты [7–9]. СК – известный участник защиты от биотрофов, индуцирующий экспрессию маркерных генов *PR1* (маркер развития системной приобретенной устойчивости), *PR2* (β -1,3-глюканазы) и *PR5* (тауматин-подобные белки) [9], тогда как ЖК эффективна против некротрофных патогенов и насекомых-вредителей и активирует экспрессию семейств генов *PR3* (хитиназы), *PR4* (белки с нуклеазной активностью), *PR6* (ингибиторы протеиназ) и *PR9* (пероксидазы) [8]. Соответственно, при инфицировании гембиотрофным патогеном, таким как *P. infestans*, СК-зависимые реакции эффективны во время биотрофной фазы, а ЖК-зависимые – во время некротрофной фазы [7, 8].

Особое место в системном и клеточном иммунитете растений занимает механизм, названный Файером и Мэллоу термином “РНК-интерференция” (РНКи), по аналогии с наложением волн в физике – высоко видоспецифичный иммунный компонент, являющийся эволюционно консервативным [10]. РНКи принадлежит ключевая роль в эпигенетических изменениях, контроле перемещения мобильных генетических элементов, регуляции экспрессии генов, стабильности генома и образования гетерохроматина, а также в осуществлении реакций в ответ на действия различных стрессовых факторов [10,

11]. Механизм РНКи регулирует экспрессию генов эукариот по принципу гомологии. В процессе участвуют малые РНК (20–26 п.о.) и взаимодействующий с нуклеиновыми кислотами комплекс белков, включающий РНК-зависимую РНК-полимеразу, Dicer-подобные белки (DCL), белки-аргонаты (Ago) и белки, задействованные в процессе РНК-зависимого ДНК-метилирования. Фермент DCL расщепляет двуцепочечные РНК на короткие фрагменты, включающиеся в белковый комплекс RISC (РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс), связываясь с белками Ago, взаимодействующими затем с целевым гомологичным фрагментом РНК [10, 11].

Посредством механизма РНКи в организме формируется уникальная и эффективная стратегия защиты от патогенных микроорганизмов – хозяин-индуцированный генный сайленсинг. На современном этапе исследований описано формирование этого механизма с участием отвечающих за РНКи белков растений картофеля, инокулированных оомицетом *P. infestans* [12, 13]. Хорошо известно о наличии у оомицетов, представителей рода *Phytophthora*, супрессоров сайленсинга, способствующих инфицированию растения. Описано наличие и механизмы действия супрессоров сайленсинга PSR1 и PSR2 для *Phytophthora sojae* и *P. capsici* [14–17]. Так, заражение растений арабидопсиса *P. capsici* приводит к увеличению производства разнообразного пула вторичных малых интерферирующих РНК (миРНК), которые обнаруживаются во внеклеточных везикулах и, вероятно, подавляют гены-мишени у патогена. Эффектор PSR2 специфически ингибирует биогенез вторичной миРНК у арабидопсиса и способствует увеличению восприимчивости растений к инфекции [16]. У *P. infestans* был найден другой предположительный супрессор сайленсинга – Pi14054 [19]. Так, внедрение последовательности гена Pi14054 в геном вируса морщинистости репы (TCV) на место известного вирусного супрессора РНКи вызывало такие же реакции у растений, как и нативный вирус, в частности, снижение экспрессии генов *Ago* и *DCL* [19]. Наличие в арсенале *Phytophthora* различных видов супрессоров сайленсинга показывает важность механизма РНКи в защите растений от фитопатогенов данного рода, стремящихся его преодолеть [20].

Влияние эндофитов на механизм РНКи растения-хозяина остается крайне малоизученным. Так, по последним данным, под действием *B. amyloliquefaciens* Va13 количество вирусных частиц вируса желтой курчавости листьев томата (TYLCV) в листьях томата снижалось на 70.1%, а транскрипционная активность генов *Ago3*, *Ago4*, *Ago5* и *Ago7* увеличивалась в 2.44–6.73 раза [3].

В связи с этим целью работы является оценка влияния инокуляции растений картофеля

эндофитными бактериями штамма *B. velezensis* M66 на механизм РНКи при инфицировании их различными по агрессивности штаммами оомицета *P. infestans* 1840 и *P. infestans* Sn.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный и микробный материал. В работе использовали стерильные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Ранняя Роза, полученные методом микроклонирования и выращенные в пробирках с МС-средой [21] в климатической камере KBW E6 (Binder GmbH, Германия) с 16-часовым световым периодом при 20–22°C в течение 21 суток.

Бактерии штамма *Bacillus velezensis* M66 были выделены из внутренних тканей стеблей картофеля сорта Удача (Чишминский район, Башкортостан) и депонированы в коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики УФИЦ РАН [22]. Последовательность 16sРНК штамма зарегистрирована в базе GenBank (accession number PP396155). Культуру бактерий выращивали на жидком лизогенном бульоне (LB) (1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 0.5% NaCl) при 20–22°C на лабораторных шейкерах OS-20 (BioSan, Латвия) (120 об./мин).

Для формирования системы “растение + эндофит” стерильные 15-дневные растения картофеля инокулировали по ранее описанной методике [6, 23] с бактериями *B. velezensis* M66, выращенными на питательной среде LB, путем нанесения мазка бактериальной массы на нижнюю треть стебля.

Фитопатоген и инокуляция. Для инфицирования растений картофеля использовали зооспоры двух штаммов оомицета *P. infestans* 1840 и *P. infestans* Sn. Патоген выращивали на агаризованной ржаной среде в течение 7 дней [24]. Поверхности колоний промывали дистиллированной водой при температуре 4°C в течение 30 мин, после чего оценивали в камере Фукса-Розенталя количество спорангиев. Растения инфицировали 10⁵ спор/мл суспензией на 7 сутки после инокуляции бактериальной массой. Исследование симптомов проводили с использованием фитопатологических газонов, на 10 сутки после заражения растений возбудителем фитофтороза, пораженность определяли в процентах площади поражения к общей площади листьев. Изображения исследовали с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США). В качестве контроля использовали растения, обработанные водой и не зараженные патогеном.

Определение титра эндофитных микроорганизмов в тканях растений. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) эндофитных микроорганизмов определяли через 24 ч после инфицирования растений *P. infestans*. Для этого

навески по 100 мг экспериментальных растений (из верхушечной части или корней 3 разных растений), поверхностно стерилизовали по следующей схеме: 70% этанол – 1 мин; 5% раствор пероксида водорода – 3 мин; дистиллированная вода. Стерильность поверхности определяли по отсутствию роста бактерий в отпечатках листьев и корней на поверхности агаризованной среды LB. Навески растений гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением 2 мл стерильной воды. Аликвоты гомогената после разбавления (100 мкл) распределяли по поверхности агаризованной среды LB при помощи шпателя Дригальского до полного высыхания. Чашки Петри инкубировали при температуре 28°C в термостате ТС-1/20 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) в течение 24 ч. Подсчет КОЕ производили во втором и третьем разведении, и их количество пересчитывали на 1 г сырой массы растений [6, 23].

Биохимические исследования. Навеску пробирочных растений растирали в 0.025 М фосфатном буфере (pH 6.2) в соотношении 1 : 5, экстрагировали 30 мин при 4°C, затем центрифугировали 10 мин при 8000 g на микроцентрифуге 5415R (Eppendorf, США). Активность пероксидазы измеряли микрометодом с использованием орто-фенилендиамина в качестве субстрата. Концентрацию пероксида водорода измеряли с использованием красителя ксиленолового оранжевого. Для определения активности ингибитора трипсина использовали реакцию с субстратом Nα-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид (БАПНА). Оптическую плотность определяли на спектрофотометре LS-55 (Perkin Elmer, США) при длине волны 409 нм [6].

Выделение тотальной РНК и проведение ПЦР в режиме реального времени. Выделение тотальной РНК проводили через 24 ч после инокуляции растений картофеля суспензией спор *P. infestans*, с использованием реактива “Лира” (Биолабмикс, Россия), согласно протоколу фирмы-поставщика. Для этого растения фиксировали в жидком азоте. Содержание нуклеиновых кислот измеряли по A260/A280 на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США), предварительно растворив образцы в трис-ЭДТА буфере.

Для получения кДНК на основе РНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы, согласно протоколу фирмы-поставщика “Синтол” (Россия). Анализ экспрессии генов *StPR*-белков (*S. tuberosum* PR-гены) и генов системы РНКи проводили методом количественной ПЦР на приборе CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Изменения в транскрипционной активности генов (оценка

числа копий мРНК для каждого гена) определяли относительно референсного гена актина с помощью программного обеспечения iCycler iQ5 Real Time Detection System software (Bio-Rad, США). Используемые в работе нуклеотидные последовательности праймеров приведены в табл. 1 (Дополнительные материалы).

Статистика. Все опыты проведены в 3–5 биологических и 3 аналитических повторностях. Экспериментальные данные выражали в виде средних значений \pm стандартные ошибки, значения которых рассчитывали для всех вариантов обработок с использованием MS Excel. Значимость различий оценивали с применением дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Дункана ($P < 0.05$) с помощью программного обеспечения STATISTICA 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из двух исследованных штаммов возбудителя фитофтороза штамм *P. infestans* Sn обладал несколько большей агрессивностью, что выразилось в более сильном, чем в случае *P. infestans* 1840, проявлении симптомов болезни на листьях растений картофеля (рис. 1а). При этом обработка растений клетками бактерий *B. velezensis* M66 сокращала площадь развития характерных для фитофтороза симптомов на листьях в равной степени для обоих штаммов.

Оценка числа клеток эндофитного штамма *B. velezensis* M66 в тканях растений картофеля, инфицированных возбудителем фитофтороза, показала присутствие до $66.75 \pm 9.9 \times 10^4$ КОЕ *B. velezensis* M66/г сырой массы побегов к восьмым суткам после инокуляции бактериями

(рис. 1б). Интересно, что уже к первым суткам после инфицирования растений картофеля суспензией спор патогена *P. infestans* Sn наблюдалось до $199.3 \pm 18.0 \times 10^4$ КОЕ *B. velezensis* M66/г сырой массы побегов, а при инфицировании *P. infestans* 1840 – до $109.3 \pm 13.2 \times 10^4$ КОЕ/г сырой массы побегов. Таким образом, инфицирование преобработанных клетками *B. velezensis* M66 растений картофеля разными штаммами патогена увеличивало численность клеток бактерий в растениях.

Анализ биохимических показателей выявил, что штамм *P. infestans* Sn вызывал резкое снижение содержания пероксида водорода и препятствовал увеличению активности пероксидаз в инфицированных растениях, в случае же со слабовирулентным штаммом *P. infestans* 1840 наблюдалась активация пероксидаз, на фоне отсутствия выраженного накопления H_2O_2 (рис. 2). В обоих случаях активность ингибиторов протеиназ была выше контрольных показателей. Под действием бактерий *B. velezensis* M66 в неинфицированных растениях увеличивалась активность ингибиторов протеиназ и пероксидаз, однако окислительного взрыва не наблюдалось. Инфицирование обработанных эндофитными бактериями растений *P. infestans* Sn частично предотвращало резкое снижение уровня H_2O_2 , но не влияло на остальные показатели относительно наблюдаемых в не содержащих эндофиты инфицированных растениях. При этом в обработанных *B. velezensis* M66 растениях после инфицирования *P. infestans* 1840 наблюдалось двукратное превышение содержания H_2O_2 , активности ингибиторов протеиназ и увеличение на 40% активности пероксидаз относительно контрольных показателей (рис. 2).

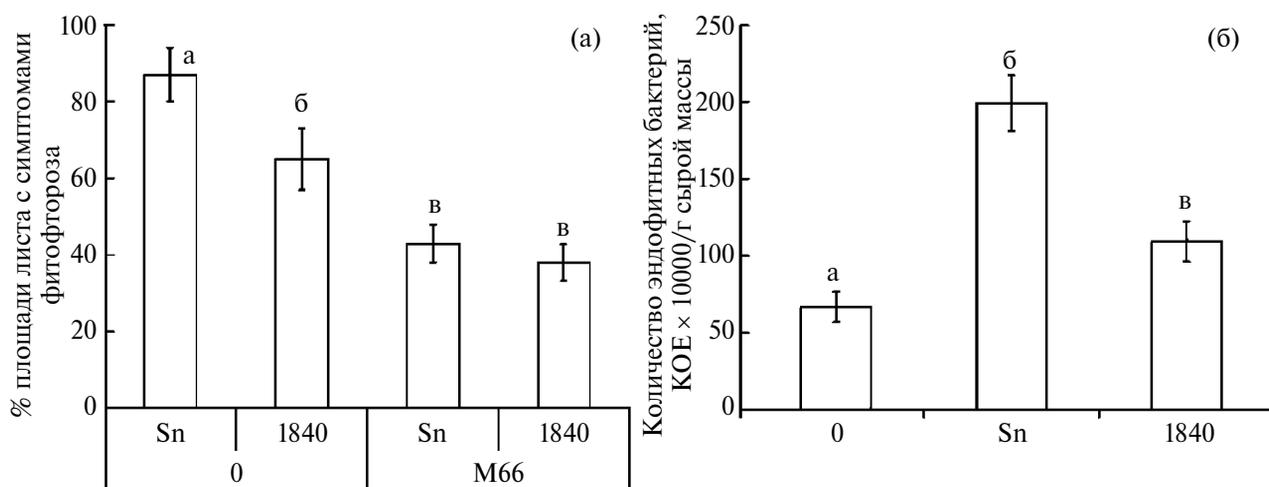


Рис. 1. Процент площади листовой пластинки с видимыми симптомами фитофтороза на растениях картофеля под влиянием бактерий *Bacillus velezensis* M66 на 8 сутки после нанесения спор патогена (а); количество КОЕ эндофитных бактерий *B. velezensis* M66 в тканях картофеля через 24 ч после инфицирования возбудителем фитофтороза (б). 0 – неинфицированные растения. Разными буквами обозначены варианты, показавшие статистически значимые отличия друг от друга ($P \leq 0.05$).

Под воздействием возбудителей фитофтороза *P. infestans* Sn и *P. infestans* 1840 активность транскрипции гена *StPR1* значительно увеличивалась, в особенности, в случае агрессивного штамма *P. infestans* Sn, под воздействием которого также снижалось количество транскриптов гена *StPR9*. Инфицирование растений *P. infestans* 1840 вызывало также увеличение транскрипционной активности гена *StPR2* (рис. 3).

При контакте растений с *B. velezensis* M66 относительное содержание транскриптов гена *StPR1*, напротив, снижалось, а других рассматриваемых генов оставалось без изменений. В случае воздействия *P. infestans* Sn на растения, обработанные *B. velezensis* M66 наблюдалось 1.5–2-кратное увеличение относительного содержания транскриптов исследуемых генов (*StPR1*, *StPR2*, *StPR9*) по отношению к неинфицированным и неинокулированным растениям (рис. 3). В случае инфицирования *P. infestans* 1840 растений, обработанных *B. velezensis* M66, уровень транскриптов поднимался на 50% относительно контрольных растений только для генов *StPR6* и *StPR9* (рис. 3).

Под воздействием возбудителей фитофтороза штаммов *P. infestans* Sn и *P. infestans* 1840 активность транскрипции гена *StAgo1* значительно не изменялась, а количество транскриптов гена *StAgo4* увеличивалось в 2 раза относительно контрольных показателей только в случае инфицирования штаммом *P. infestans* 1840 (рис. 4). При этом транскрипционная активность гена *StDCL1* увеличивалась под воздействием обо-

их исследуемых штаммов, причем в случае *P. infestans* 1840 — более значительно.

Во всех вариантах воздействия на растения *B. velezensis* M66, как в здоровых, так и инфицированных обоими штаммами *P. infestans* наблюдалось увеличение относительного содержания транскриптов гена *StAgo1* на 30% относительно неинфицированных и неинокулированных растений (рис. 4), чего не наблюдалось под воздействием оомицета в отдельности. При этом присутствие *B. velezensis* M66 в тканях здоровых растений снижало содержание транскриптов гена *StDCL1* на 50% относительно контрольных растений, что было прямо противоположно эффекту заражения оомицетом. Так, в случае инфицирования содержащих эндофитные клетки *B. velezensis* M66 растений *P. infestans* Sn происходило двукратное увеличение содержания транскриптов гена *StDCL1*, а под воздействием *P. infestans* 1840 превышение содержания транскриптов достигало 70%, что соответствует тенденции, наблюдаемой в инфицированных растениях, не содержащих эндофитных бактерий (рис. 4). Интересно, что при совместном влиянии на растения бактериального штамма и обоих исследуемых штаммов оомицетов транскрипционная активность гена *StAgo4* увеличивалась в той же степени, что и под индивидуальным воздействием менее агрессивного штамма *P. infestans* 1840, что говорит о важности его продукта в защитных реакциях от фитофтороза и возможном подавлении транскрипции этого гена более агрессивным штаммом *P. infestans*.

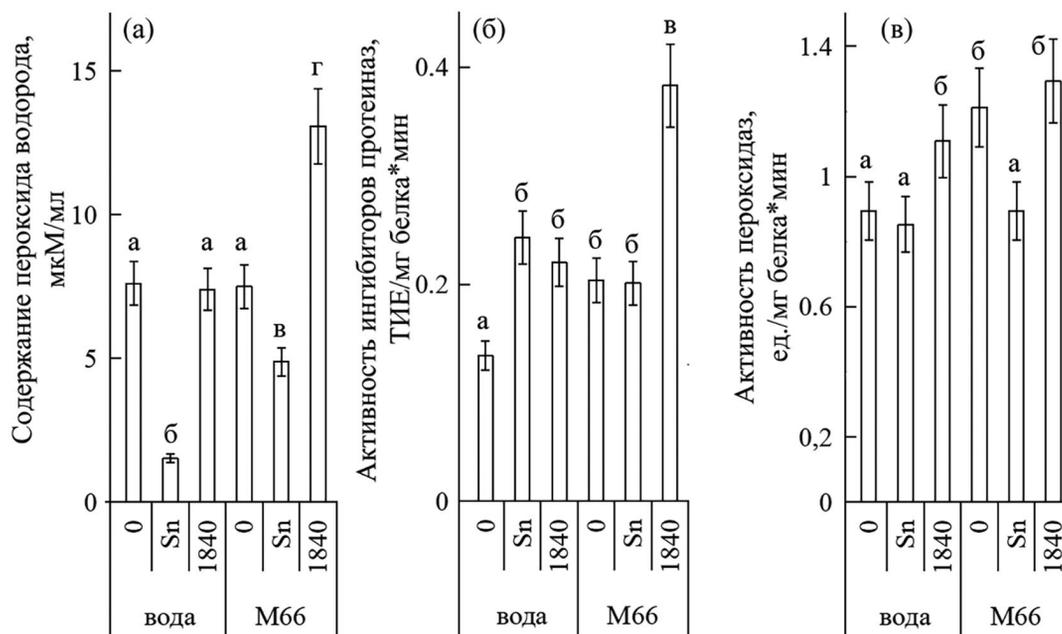


Рис. 2. Влияние бактерий *Bacillus velezensis* M66 на содержание пероксида водорода (а), активность ингибиторов трипсина (б) и пероксидаз (в) в здоровых и инфицированных штаммами возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* 1840 и *P. infestans* Sn растениях картофеля через 24 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены варианты, показавшие статистически значимые отличия друг от друга ($P \leq 0.05$).

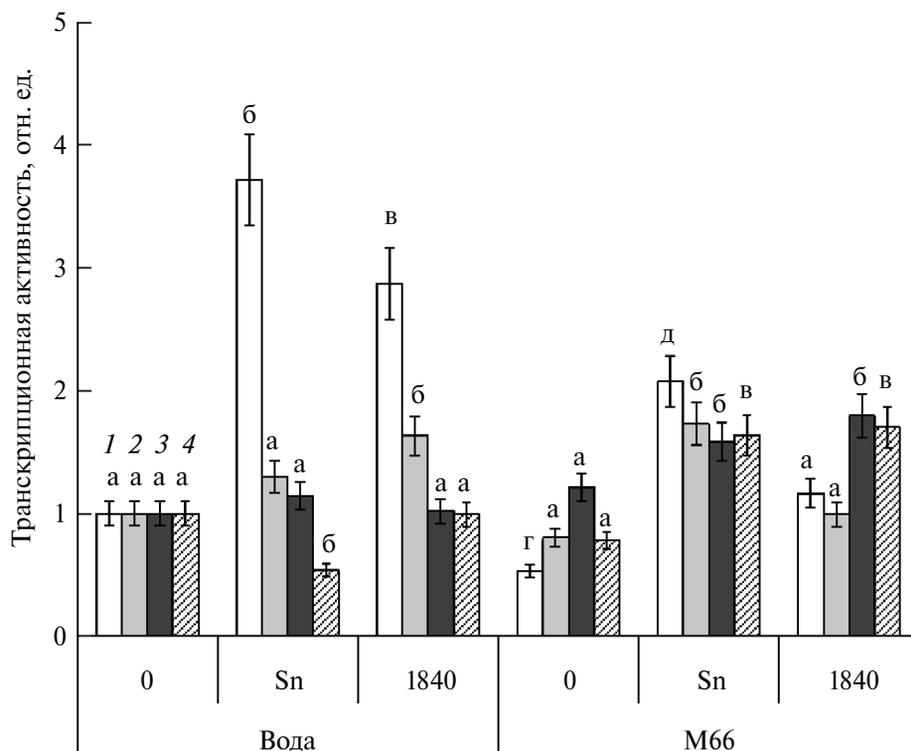


Рис. 3. Влияние бактерий *Bacillus velezensis* M66 на относительное количество транскриптов генов ингибитора трипсина *StPR6* (1), основного защитного белка – индикатора развития системной приобретенной устойчивости *StPR1* (2), хитиназы *StPR2* (3) и анионной пероксидазы *StPR9* (4) в здоровых и инфицированных штаммами возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* 1840 и *P. infestans* Sn растениях картофеля (24 ч после нанесения спор патогена). Транскрипционная активность каждого исследуемого гена нормализована относительно референсного гена актина картофеля. Разными буквами обозначены варианты, показавшие статистически значимые отличия друг от друга ($P \leq 0.05$). Сравнение производилось для каждого конкретного гена в отдельности.

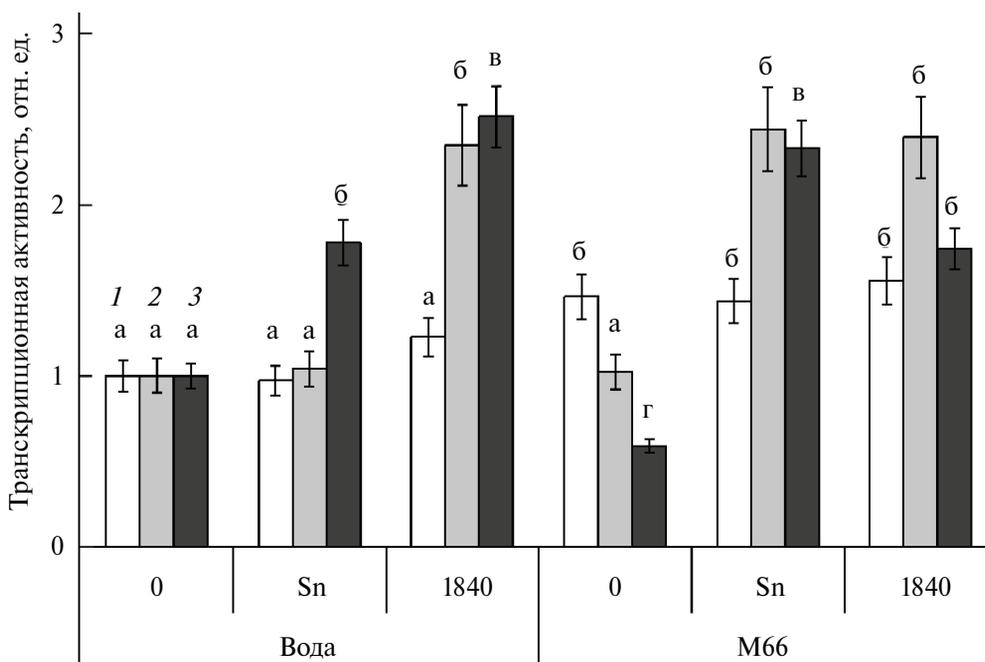


Рис. 4. Влияние бактерий *Bacillus velezensis* M66 на относительное количество транскриптов генов системы РНК-интерференции *StAgo1* (1), *StAgo4* (2) и *StDCL* (3) в здоровых и инфицированных штаммами возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* 1840 и *P. infestans* Sn растениях картофеля (24 ч после нанесения спор патогена). Транскрипционная активность каждого исследуемого гена нормализована относительно референсного гена актина картофеля. Разными буквами обозначены варианты, показавшие статистически значимые отличия друг от друга ($P \leq 0.05$). Сравнение производилось для каждого конкретного гена в отдельности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Совместная эволюция предковых растений с микроорганизмами, вероятно, насчитывает более 450 млн лет [25], с заселения ими суши. Эндofиты, как и патогенные микроорганизмы, наиболее тесно встроены в экологическую нишу, предоставляемую растением, но меньше всего мы располагаем информацией об основных принципах организации их “трехчастного” симбиоза [1, 2, 25].

Так, если эндofитно существующие в тканях макросимбионта бактерии способны участвовать в биоконтроле фитопатогенов и праймировать иммунные реакции растений [1, 2, 25], то патоген вступает во взаимодействие со всей этой системой, и, соответственно, может оказывать прямое и опосредованное иммунными реакциями растения влияние на состав мутуалистической флоры. В нашей работе впервые показано, что инфицирование растений возбудителем фитофтороза вызвало увеличение числа клеток эндofитных микроорганизмов в тканях хозяина, причем в случае с инфицированием растений более агрессивным штаммом *P. infestans* Sn наблюдался более выраженный эффект на этот параметр. Важно отметить, что снижение площади симптомов фитофтороза на листьях содержащих эндofитные бактерии *B. velezensis* M66 растений было одинаковым в случае обоих штаммов, что говорит о вероятной значимости количества ассоциированных с растением микроорганизмов в реализации защитного ответа целостной системы растение/сообщество эндofитов. Так, ранее нами было показано, что под влиянием СК происходит увеличение количества КОЕ *B. subtilis* 26Д, что может быть одним из факторов, обуславливающих более высокий защитный эффект против фитофтороза, чем в варианте обработки *B. subtilis* 26Д индивидуально на фоне крайне низкого воздействия взятой концентрации СК на устойчивость растений к патогену [26].

Обработка растений *B. velezensis* M66 стимулировала в них активность ингибиторов протеиназ и пероксидаз растений в отсутствие патогена, формируя некоторый конститутивный барьер для инфицирования. Это, по-видимому, являлось одним из факторов, обеспечивающих защитный эффект, так как, например, высокая агрессивность штамма *P. infestans* Sn могла быть связана именно подавлением иммунного ответа растений, в частности, реакций, связанных с развитием окислительного взрыва (снижение содержания пероксида водорода, активности пероксидаз и транскрипционной активности гена анионной пероксидазы (*StPR9*), и, вероятно, других ЖК-зависимых механизмов). Об этом косвенно свидетельствует многократное на-

копление транскриптов маркера СК-зависимых реакций, гена *StPR1*, в инфицированных *P. infestans* Sn растениях [7].

Большинство ассоциированных с растениями микроорганизмов активируют индуцированную системную устойчивость через ЖК-зависимый сигнальный путь [25]. Ранее нами было показано участие ЖК в защитном ответе картофеля на возбудитель фитофтороза *P. infestans* и увеличение транскрипционной активности ЖК-зависимых генов и генов биосинтеза ЖК под действием штамма *B. subtilis* 26Д [6]. В данной работе показано, что обработка растений суспензией клеток эндofитного штамма *B. velezensis* M66 приводила к накоплению транскриптов ЖК-зависимых генов *StPR6* и *StPR9* в растениях, инокулированных двумя штаммами возбудителя фитофтороза, а также полностью нивелировала увеличение транскрипции СК-зависимых генов в инфицированных менее агрессивным штаммом, и снижала таковое в инфицированных более агрессивным штаммом растениях. Следует отметить, что выбранная временная точка соответствует переходу возбудителя фитофтороза из биотрофной фазы в некротрофную, и, вероятно, увеличение транскрипционной активности ЖК-зависимых генов является ключевым событием на этом этапе [7, 8].

В развитии устойчивости растений к патогенам важную роль играет эпигенетическая регуляция, включающая механизмы РНКи. Белки DCL и Ago являются неразрывно связанными компонентами механизма РНКи, поскольку при их совместном участии генерируются микроРНК (miRNA), подавляющие гены-мишени патогена [27]. Поэтому увеличение транскрипции исключительно гена *StDCL1* при инфицировании *P. infestans* Sn, вероятно, было индуцировано патогеном и не обеспечивало эффективной защиты от внедрения патогена в ткани. В экспериментах с использованием риса и арабидопсиса при грибной инфекции сайленсинг гена *DCL1* приводил к усилению устойчивости к *Magnaporthe oryzae* и *Sclerotinia sclerotiorum*, соответственно [28, 29]. Присутствие эндofитных бактерий в тканях растений без инфицирования патогеном, напротив, подавляло транскрипционную активность данного гена, что, однако, не было препятствием для увеличения этого параметра в присутствии патогена.

Менее агрессивный штамм *P. infestans* 1840, помимо *StDCL1*, воздействовал на транскрипционную активность гена *StAgo4*, который считается важным компонентом в регуляции устойчивости растений к биотическим воздействиям [27]. Так, *Ago4* оказался важным в формировании защитной реакции у растений ди-

кого табака *Nicotiana attenuata* к возбудителю стеблевых гнилей грибу *Fusarium brachygibbosum*, а замалчивание его синтеза нарушало работу жасмонатной сигнальной системы [30]. Транскрипционная активность этого гена была высокой в инфицированных обоими штаммами растениях, обработанных *B. velezensis* M66, что могло обусловить их возросшую устойчивость к фитофторозу.

Обработка растений *B. velezensis* M66 приводила к увеличению уровня транскриптов гена *StAgo1*, в равной степени в неинфицированных и инфицированных штаммами возбудителя фитофтороза растениях, что являлось специфической особенностью растений, содержащих эндофитные микроорганизмы. Основная функция белков Ago в растениях – связывание siRNA и miRNA, генерируемых с участием DCL белков, а также их использование в качестве “направляющего” при узнавании и последующем расщеплении РНК генов-мишеней на транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном уровнях [1, 2]. Имеющая гомологию с участком гена, кодирующего транскрипционный фактор семейства AP2/ERF (факторы, участвующие в регуляции ЖК-зависимых реакций), miR172 идентифицирована как регулятор устойчивости растений томатов к оомицету *P. infestans* [31]. Важно отметить, что в нашей работе в растениях картофеля, обработанных *B. velezensis* M66 наблюдалась повышенная относительно контрольных значений активность транскрипции как генов *Ago*, так и зависимых от ЖК генов *StPR6* и *StPR9*.

Таким образом, эндофитные микроорганизмы, такие как *B. velezensis* M66, могут быть эффективными агентами для защиты растений от патогенов благодаря очень глубокой интеграции в систему регуляции фитоиммунного потенциала растений, и их использование в качестве компонентов биопрепаратов для защиты растений является весьма перспективным.

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 24-26-00025 “Перспектива применения выделенных на территории Южного Урала эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к комплексу биотических факторов среды”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu X., Wang Z., Zhang R., Xu T., Zhao J., Liu Y. Diversity of endophytic bacteria in hybrid maize seeds and *Bacillus mojavensis* J2416-7 may be capable of vertical transmission // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. P. 213. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02824-x>
2. Kim J.A., Song J.S., Kim P.I., Kim D.H., Kim Y. *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a promising agent for biocontrol of plant pathogenic fungi // J. Fungi (Basel). 2022. V. 8. P. 1053. <https://doi.org/10.3390/jof81010532>
3. Guo Q., Sun Y., Ji C., Kong Z., Liu Z., Li Y., Li Y., Lai H. Plant resistance to tomato yellow leaf curl virus is enhanced by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 through modulation of RNA interference // Front. Microbiol. 2023. V. 14. P. 1251698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1251698>
4. Shi Z., Hong W., Wang Q. Complete genome resource of *Bacillus velezensis* J17-4, an endophyte isolated from stem tissues of rice // Plant Dis. 2022. V. 106. P. 727. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0996-A>
5. Cheffi M., Bouket A.C., Alenezi F.N., Luptakova L., Belka M., Vallat A., Rateb M.E., Tounsi S., Triki M.A., Belbahri L. *Olea europaea* L. root endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 counteracts oomycete and fungal harmful pathogens and harbours a large repertoire of secreted and volatile metabolites and beneficial functional genes // Microorganisms. 2019. V. 7. P. 314. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090314>
6. Sorokan A., Benkovskaya G., Burkhanova G., Blagova D., Maksimov I. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26DCryChS producing CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes multifaceted potato defense against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and pest *Leptinotarsa decemlineata* Say // Plants. 2020. V. 9: 1115. <https://doi.org/10.3390/plants9091115>
7. Coles D.W., Bithell S.L., Mikhael M., Cuddy W.S., Plett J.M. Chickpea roots undergoing colonisation by *Phytophthora medicaginis* exhibit opposing jasmonic acid and salicylic acid accumulation and signaling profiles to leaf hemibiotrophic models // Microorganisms. 2022. V. 10: 2. P. 343. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020343>
8. Li N., Han X., Feng D., Yuan D., Huang L.-J. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 671. <https://doi.org/10.3390/ijms20030671>
9. Huang S., Zhang X., Fernando W.G.D. Directing trophic divergence in plant-pathogen interactions: antagonistic phytohormones with NO doubt? // Front. Plant Sci. 2020. V. 11: 600063. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.600063>
10. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by

- double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. 1998. V. 391: 6669. P. 806.
<https://doi.org/10.1038/35888>
11. Maksimov, I.V., Shein, M.Y. & Burkhanova, G.F. RNA Interference in plant protection from fungal and oomycete infection // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 16–31.
<https://doi.org/10.1134/S000368382210106>
 12. Jahan S.N., Asman A.K., Corcoran P., Fogelqvist J., Vetukuri R.R., Dixelius C. Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 2785.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv094>
 13. Sanju S., Siddappa S., Thakur A., Shukla P.K., Srivastava N., Pattanayak D., Sharma S., Singh B.P. Host-mediated gene silencing of a single effector gene from the potato pathogen *Phytophthora infestans* imparts partial resistance to late blight disease // Funct. Integr. Genomic. 2015. V. 15. P. 697.
<https://doi.org/10.1007/s10142-015-0446-z>
 14. Qiao Y., Liu L., Xiong Q., Flores C., Wong J., Shi J., Wang X., Liu X., Xiang Q., Jiang S., Zhang F. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors // Nat. Genet. 2013. V. 45. P. 330.
<https://doi.org/10.1038/ng.2525>
 15. Gui X., Zhang P., Wang D., Ding Z., Wu X., Shi J., Shen Q-H., Xu Y-Z., Ma W., Qiao Y. *Phytophthora* effector PSR1 hijacks the host pre-mRNA splicing machinery to modulate small RNA biogenesis and plant immunity // Plant Cell. 2022. V. 34: 9. P. 3443.
<https://doi.org/10.1093/plcell/koac176>
 16. Hou Y., Zhai Y.I., Feng L.I., Karimi H.Z., Rutter, B.D., Zeng L., Choi D.S., Zhang B., Gu W., Chen X., Ye W., Innes R.W., Zhai J., Ma W. A *Phytophthora* effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility // Cell Host Microbe. 2019. V. 25. P. 153.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.007>
 17. de Vries S., von Dahlen J.K., Uhlmann C., Schnake A., Kloesges T., Rose L.E. Signatures of selection and host-adapted gene expression of the *Phytophthora infestans* RNA silencing suppressor PSR2 // Mol. Plant Pathol. 2017. V. 18. P. 110.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12465>
 18. Xiong Q., Ye W., Choi D., Wong J., Qiao Y., Tao K., Wang Y., Ma W. *Phytophthora* suppressor of RNA silencing 2 is a conserved RxLR effector that promotes infection in soybean and *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. V. 27. P. 1379.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0190-R>
 19. Vetukuri R.R., Whisson S.C., Grenville-Briggs L.J. *Phytophthora infestans* effector Pi14054 is a novel candidate suppressor of host silencing mechanisms // Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 149. P. 771.
<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1222-9>
 20. Parperides E., El Mounadi K., Garcia-Ruiz H. Induction and suppression of gene silencing in plants by nonviral microbes // Mol. Plant Pathol. 2023. V. 24. P. 1347.
<https://doi.org/10.1111/mpp.13362>
 21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 22. Каталог штаммов и изолятов коллекции эндофитных микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (2018), Уфа. <http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc>
 23. Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Максимов И.В. Влияние совместной обработки эндофитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* В-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 109.
<https://doi.org/10.17223/19988591/53/6>
 24. Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding // Plant Dis. 2012. V. 96(1). P. 4-17.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0458>
 25. Kumawat K.C., Razdan N., Saharan K. Rhizospheric microbiome: bio-based emerging strategies for sustainable agriculture development and future perspectives // Microbiol. Res. 2022. V. 254: 126901.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126901>
 26. Sorokan A., Burkhanova G., Gordeev A., Maksimov I. Exploring the role of salicylic acid in regulating the colonization ability of *Bacillus subtilis* 26D in potato plants and defense against *Phytophthora infestans* // Int. J. Plant Biol. 2023. V. 14. P. 242.
<https://doi.org/10.3390/ijpb14010020>
 27. Huang Ch.-Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H. Small RNAs – big players in plant-microbe interactions // Cell Host Microbe. 2019. V. 26. P. 173.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.021>
 28. Zhang D., Liu M., Tang M., Dong B., Wu D., Zhang Z., Zhou B. Repression of microRNA biogenesis by silencing of *OsDCL1* activates the basal resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice // Plant Sci. 2015. V. 237. P. 24.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.002>
 29. Cao J.Y., Xu Y.P., Li W., Li S.S., Rahma, H., Cai X.Z. Genome-wide identification of *Dicer-like*, *Argonaute*, and *RNA-dependent RNA polymerase* gene families in *Brassica* species and functional analyses of their Arabidopsis homologs in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1614.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01614>
 30. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. Argonaute4 modulates resistance to *Fusarium brachygibbosum* infection by regulating jasmonic acid signaling // Plant Physiol. 2020. V. 184. P. 1128.
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00171>
 31. Luan Y., Cui J., Li J., Jiang N., Liu P., Meng J. Effective enhancement of resistance to *Phytophthora infestans* by overexpression of miR172a and b in *Solanum lycopersicum* // Planta. 2018. V. 247. P. 127.
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2773-x>

УДК 581.1

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕЛАНИЗИРОВАННОГО ТАЛЛОМА ЛИШАЙНИКА *Cetraria islandica*© 2024 г. А. Г. Даминова^{а, *}, Е. И. Галеева^а, Д. Ф. Рахматуллина^а,
Л. В. Викторова^а, Ф. В. Минибаева^{а, б}^аКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия^бКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: daminova.ag@gmail.com

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 18.03.2024 г.

Лишайники представляют собой экстремофильные симбиотические ассоциации, обладающие феноменальной устойчивостью к действию абиотических стрессовых факторов. Меланизация талломов является одним из защитных механизмов лишайников в ответ на УФ-воздействие в условиях избыточной инсоляции. Микроструктура и биохимические особенности меланизированных талломов лишайников, однако, остаются малоизученными. В настоящей работе мы проанализировали морфологию, наномеханические и физиолого-биохимические свойства естественно-меланизированных талломов лишайника *Cetraria islandica*. Меланиновая природа пигментированного слоя верхнего кортекса таллома *C. islandica* подтверждена окрашиванием в результате качественных реакций, характерных для меланинов. Установлено, что меланизация приводит к изменениям микроструктуры верхнего кортекса микобионта, в частности утолщению клеточных стенок и увеличению межгифового пространства. Наномеханические свойства, в том числе параметры адгезии и жесткости, отличались у меланизированных и бледных (немеланизированных) талломов, что свидетельствует о возможном образовании сложных ассоциатов меланина с компонентами клеточных стенок микобионта при меланизации. Кроме того, обнаружено, что меланизированные талломы *C. islandica* характеризуются высокой антиоксидантной активностью и пониженной дыхательной активностью, по сравнению с таковыми у бледных талломов. Можно полагать, что изменения в микроструктуре, наномеханических и физиолого-биохимических свойствах талломов, происходящие в ходе меланизации, способствуют формированию устойчивости лишайников к воздействию интенсивной инсоляции.

Ключевые слова: *Cetraria islandica*, антиоксидантная активность, дыхание, лишайники, меланизация, морфология таллома, топография

DOI: 10.31857/S0015330324040046, EDN: MOANOI

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники представляют собой фотосинтезирующие симбиотические ассоциации, таллом которых образован двумя основными партнерами — микобионтом и фотобионтом [1]. Лишайники относят к экстремофильным организмам ввиду их феноменальной устойчивости к действию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как обезвоживание, перепады температур, ультрафиолетовое (УФ) излучение [2]. Среди механизмов высокой стрессовой устойчивости лишайников немаловажную роль мо-

жет играть синтез вторичных метаболитов, в том числе меланинов. Темный пигмент меланин, синтезирующийся в некоторых видах лишайников при действии интенсивной естественной инсоляции или УФ-облучения, представлен в виде пигментированного слоя на поверхности талломов лишайников. Меланины — это продукты окислительной полимеризации фенольных или индольных соединений, способные поглощать свет широкого спектра длин волн, включая гамма-лучи, рентгеновское и УФ-излучение, что позволяет им проявлять фотопротекторные свойства [3–5]. Меланины в талломе лишайников также проявляют фотозащитные и антиоксидантные свойства [6]. В литературе представлены единичные работы по характеристике морфологии пигментированных талломов лишайников,

Сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия; Л-ДОФА — 3,4-Л-дигидроксифенилаланин; СЭМ — сканирующая электронная микроскопия; УФ излучение — ультрафиолетовое излучение.

что может быть связано со сложностью анатомического строения таллома, взаимодействием грибных и фотосинтезирующих симбионтов и разнообразием путей биосинтеза метаболитов. Так, ранее нами проанализированы микроструктура и элементный состав пигментированного слоя верхнего кортекса талломов лишайника *Lobaria pulmonaria* при УФ-В облучении [7]. Показано, что пигментация талломов *L. pulmonaria* обусловлена УФ-В индуцированным синтезом эумеланина. Меланизация талломов *L. pulmonaria* приводила к изменению наномеханических параметров, а именно уменьшению адгезионных свойств пигментированного слоя клеток верхнего кортекса талломов [8]. В качестве объекта исследования настоящей работы был выбран лишайник *Cetraria islandica* (L.) Ach. (исландский мох), микобионтом которого является гриб *Cetraria*, а фотобионтом зеленая водоросль *Trebouxia* sp. *Cetraria islandica* представляет собой разветвленный, кустистый лишайник с прямостоячим листоватым слоевищем по цвету от серовато-белого до темно-коричневого, может достигать до 7 см в высоту. Этот лишайник является представителем арктической, субарктической и альпийской растительности во всем северном полушарии. Таллом *C. islandica* широко используется в фармакологии в качестве антимикробного препарата и биологически активной добавки. Высокая биологическая активность этого лишайника во многом обусловлена наличием в талломе уникальных лишайниковых метаболитов, в частности полисахарида лихенина. Методами низкотемпературной сканирующей электронной микроскопии и иммуноцитохимии в непигментированных талломах лишайников *C. islandica* и *Evernia prunastri* в качестве структурного элемента стенки гифа гриба визуализирован лихенин, участвующий преимущественно в водном обмене [9]. Ранее было показано, что УФ-облучение индуцирует синтез меланина в талломе *C. islandica* [10, 11], однако информация о микроструктуре таллома при меланизации отсутствует в литературе. Морфология и топография таллома могут обуславливать его физико-химические свойства и физиологические функции. В связи с этим целью настоящей работы явился анализ структурных характеристик, в том числе морфологии и наномеханических свойств, а также физиолого-биохимических характеристик, в частности антиоксидантных свойств и дыхательной активности, естественно-меланизированного таллома лишайника *C. islandica*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала. Бледные и меланизированные талломы лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach. были собраны в затемненных и хорошо ос-

вещенных участках в окрестностях г. Сыктывкар. Материал очищали от загрязнений, медленно высушивали при комнатной температуре при относительной влажности 60–70% и далее хранили при температуре –20°C. Перед началом экспериментов талломы лишайника гидратировали на влажной фильтровальной бумаге при температуре 10°C в течение 24 ч.

Качественные реакции на меланин. Для проведения качественных реакций были получены поперечные срезы бледных и меланизированных талломов лишайника *C. islandica* толщиной 50 мкм с помощью вибратора Leica VT 1000S (“Leica”, Германия). Срезы были окрашены несколькими способами:

1. Срезы окрашивали 0.2% 3,4-Л-дигидроксибензилаланином (L-ДОФА) в течение 1 ч в темноте [12].

2. Срезы окрашивали 1% раствором азура II в течение 30 мин. Затем добавляли 0.5% раствор эозина на несколько минут по протоколу Рожнака [13].

3. Срезы инкубировали в 2.5% растворе FeSO_4 в течение 1 ч, затем инкубировали в 1% растворе $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в течение 30 мин, а затем в смеси этанол-ксилол (50:50 по объему) по протоколу Лилли [14].

Окрашенные срезы талломов лишайника анализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Leica DM1000 (“Leica”, Германия) и цифровой камеры (“Sony”, Китай). Для определения толщины пигментированного слоя проанализировано 15 срезов из трех биологических повторов с помощью встроенного программного обеспечения для микроскопа.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Поперечные срезы бледных и меланизированных талломов лишайника *C. islandica* фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде, приготовленном в 0.1 М Na-фосфатном буфере pH 7.4, в течение 24 ч. После обезвоживания в серии разведений этанольного спирта, срезы инкубировали в смеси гексаметилдисилазана и этанола в соотношениях 1:3, 1:1, 3:1 (по объему) по 30 мин. Далее срезы помещали в 100% гексаметилдисилазан на 60 мин. Морфологию структурированной поверхности бледных и меланизированных талломов лишайника после напыления золотом (высоковакуумная напылительная система Q150T ES, “Quorum Technologies”, Великобритания) визуализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа высокого разрешения (“Merlin”, Германия) при ускоряющем напряжении 5 кВ. Для оценки относительной толщины клеточных стенок гиф в бледных и меланизированных талломах определяли количество гиф на единицу площади поперечного сечения СЭМ-изображений с использованием графической программы ImageJ.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Бледные и меланизированные талломы лишайника *C. islandica* фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде, постфиксировали в тетроксиде осмия ("Sigma", США), обезживали в этанольном спирте в возрастающих концентрациях от 30% до 96% раствора и ацетоне. Образцы полимеризовали в смоле LR White ("Sigma", США) при 60°C в течение 24 ч. Верхнюю поверхность блоков образцов выравнивали с помощью алмазного ножа. Верхний кортекс талломов лишайника на поперечном срезе визуализировали с помощью микроскопа Bruker Dimension FastScan ("Bruker", США) в режиме PeakForceQNM с кантилеверами ScanAsyst-Air ("Bruker", США). Изображения были получены с разрешением 512 строк на сканирование.

Ферментативная активность талломов лишайников. Грубый ферментный экстракт получали путем гомогенизации регидратированного лишайника в жидком азоте и последующей экстракции в 50 mM Na-фосфатном буфере pH 7.0 в течение 1 ч. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин. Экстракт высаливали сульфатом аммония в 30–80% градиенте насыщения. После центрифугирования осадок ресуспензировали в минимальном объеме 25 mM Трис-HCl буфера pH 7.5. Активность ферментов определяли спектрофотометрически на приборе UV-1600 ("Shimadzu", Япония). Активность лакказы определяли по скорости окисления 1 mM о-дианизида ($d_{460} = 30.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в 80 mM ацетатном буфере, pH 4.5. Активность тирозиназы определяли по скорости окисления 2 mM L-DOPA ($d_{475} = 3.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в 50 mM Na-фосфатном буфере pH 6.0 [15].

Детоксикация H_2O_2 . Фрагменты бледных и меланизированных талломов *C. islandica* инкубировали в 0.05 M Na-фосфатном буфере pH 7.0 с добавлением 500 мкM H_2O_2 в темноте. Через 20, 40 и 60 мин измеряли содержание H_2O_2 в растворе инкубации с использованием ксиленолового оранжевого ($\lambda = 560 \text{ nm}$) [16] на спектрофотометре UV-1600 ("Shimadzu", Япония). Для построения калибровочной кривой использовали растворы с известным содержанием H_2O_2 . В контрольных вариантах (без добавления фрагментов таллома) изменения содержания H_2O_2 не происходило.

Интенсивность дыхания. Интенсивность дыхания бледных и меланизированных талломов лишайника *C. islandica* определяли манометрическим методом в аппарате Варбурга ("Warburg-Apparat VEB Glaswerke Stutzerbach", Германия) [17]. Расчеты проводили в мкл O_2 за 1 ч на 1 г сухой массы.

Статистика. Опыты проводили в 3–6 биологических повторностях и 3–14 аналитических повторностях. Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений

со стандартными ошибками (SE). Все экспериментальные данные имеют нормальное распределение признака. Для сравнения их средних арифметических значений использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с оценкой попарных различий с помощью критериев Тьюки, Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологический анализ талломов лишайников с помощью качественных реакций

С помощью световой микроскопии на поперечных срезах пигментированного таллома *C. islandica* был визуализирован темно-коричневый слой на поверхности верхнего кортекса, под которым располагались непигментированные гифы гриба и водоросли (рис. 1д). Толщина пигментированного слоя варьировала в среднем от 5 до 8 мкм. Для выявления меланиновой природы пигментации талломов *C. islandica* были проведены качественные реакции. Так, поперечные срезы были окрашены красителем L-ДОФА, являющимся субстратом фенолоксидаз, в том числе тирозиназ и лакказы, вовлеченных в синтез меланина [18]. После окрашивания верхний слой коры пигментированного, но не бледного, таллома *C. islandica* приобрел интенсивно коричневый цвет (рис. 1б, е). С помощью окрашивания по методу Рожняка с использованием эозина на срезах пигментированного таллома были визуализированы темно-коричневые клетки (рис. 1ж). После окрашивания по методу Лилли, основанном на окислении железа, темный пигмент также визуализировался только у пигментированных талломов *C. islandica* (рис. 1з).

Микроструктура талломов лишайника C. islandica с помощью сканирующей электронной микроскопии

Микроструктура поперечных срезов бледного и меланизированного талломов лишайника *C. islandica* была визуализирована с помощью СЭМ. Показано, что толщина верхнего кортекса меланизированного таллома больше, чем таковая бледного таллома. Так, у бледного таллома верхний коровый слой представлен грибными гифами с многочисленными порами (рис. 2а), тогда как у меланизированного таллома *C. islandica* количество пор на единицу площади поперечного сечения было в 3.8 раз меньше, что свидетельствует об утолщении клеточных стенок гиф (рис. 2б).

Наномеханические свойства талломов лишайника C. islandica с помощью атомно-силовой микроскопии

Для изучения топографии верхнего кортекса поперечных срезов талломов *C. islandica* мы проанализировали рельеф, адгезию и жесткость по-

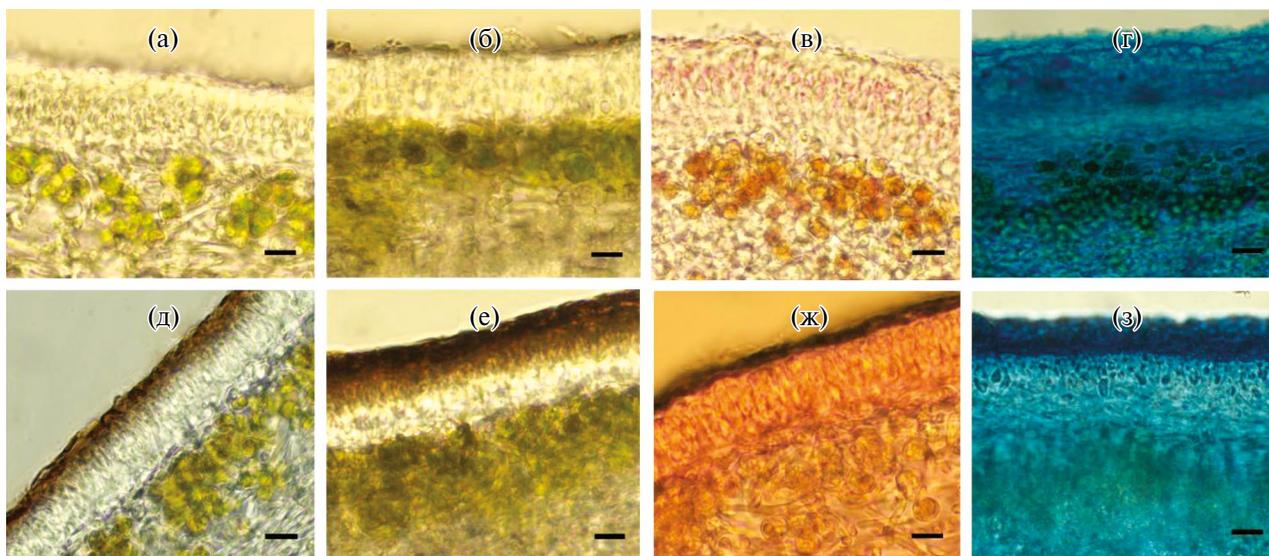


Рис. 1. Поперечные срезы бледных (а-г) и меланизированных (д-з) талломов лишайника *C. islandica*: неокрашенные талломы (а, д); L-ДОФА окрашивание (б, е); окрашивание по Рожнаку (в, ж) и по Лилли (г, з). Масштабная линейка – 10 мкм.

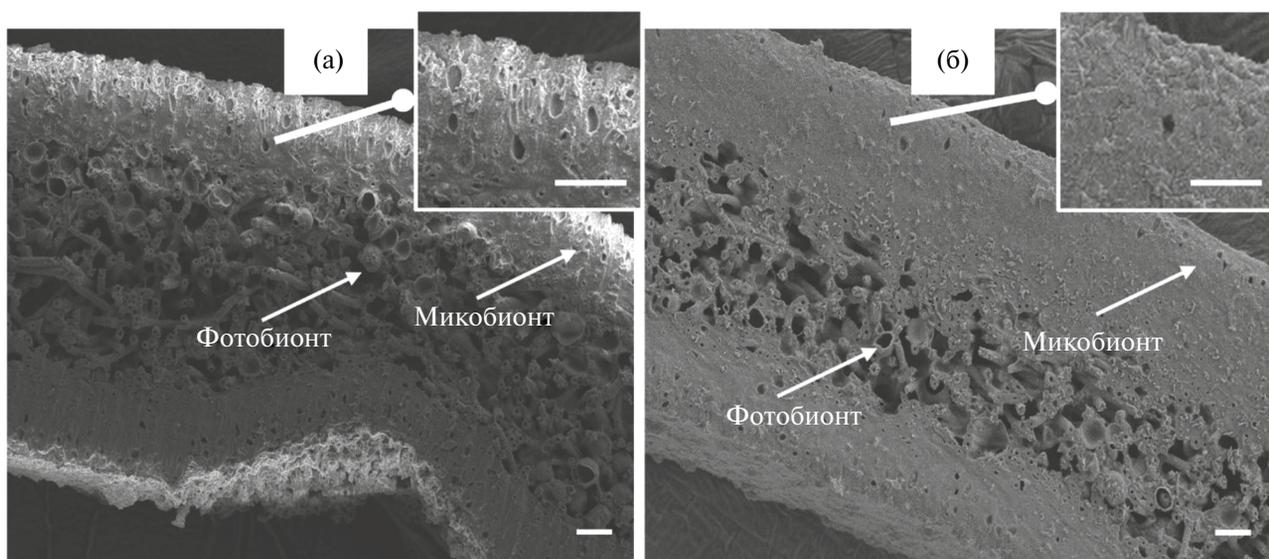


Рис. 2. Сканирующие электронные микрофотографии поперечных срезов бледного (а) и меланизированного (б) талломов лишайника *C. islandica*. Масштабная линейка – 10 мкм.

верхности срезов бледных и меланизированных талломов *C. islandica* с помощью АСМ (рис. 3).

Изображение по высоте, полученное при сканировании вдоль главной оси зондового датчика, у бледного таллома заметно отличалось от изображения меланизированного таллома. Так, цветовая насыщенность рельефа бледного таллома была в 1.2 раза выше таковой меланизированного таллома (рис. 3а, г). Адгезия поверхности меланизированного таллома примерно в четыре раза больше по сравнению с таковым значением для бледного таллома (рис. 3б, д). В то же время значение жесткости меланизированного таллома снижено более

чем в 10 раз по сравнению с показателем для бледного таллома (рис. 3в, е).

Окислительно-восстановительная и дыхательная активность бледных и меланизированных талломов C. islandica

При измерении активности фенолоксидаз, таких как лакказы и тирозиназы, наибольшие значения были детектированы для лакказ. Этот показатель у меланизированных талломов *C. islandica* составлял 167 ± 12 нкат на г^{-1} сухого вещества, что было выше в 1.3 раза по сравнению с активностью лакказы 131 ± 7 нкат на г^{-1} сухого вещества в бледном талломе. Активность

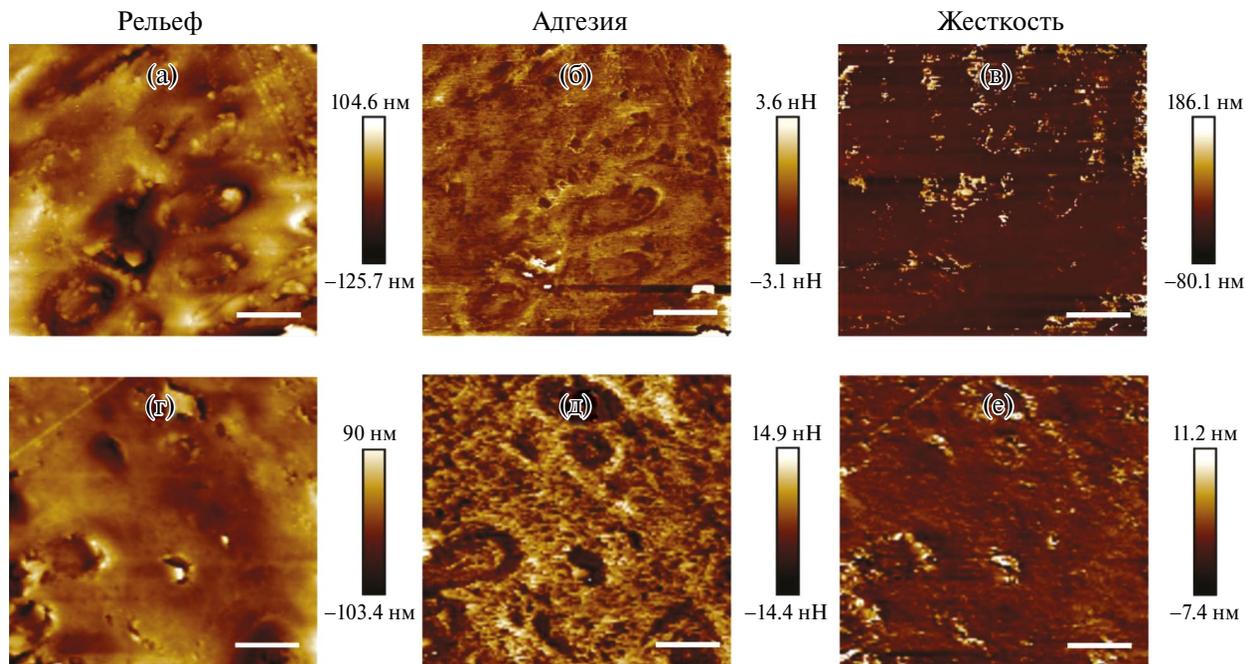


Рис. 3. Рельеф (а, г), адгезия (б, д), жесткость (в, е) поверхности поперечных срезов бледного (а–в) и меланизированного (г–е) талломов лишайника *C. islandica*, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии. Масштабная линейка – 2 мкм.

тирозины была низкой и в бледном, и в меланизированном талломах *C. islandica* (данные не представлены).

Важным показателем антиоксидантной активности образца является скорость разложения H_2O_2 . Анализ скорости деградации экзогенной H_2O_2 в концентрации 500 мкМ талломами лишайника *C. islandica* продемонстрировал, что меланизированные талломы лишайника могут

значительно более эффективно (на 50%) разлагать экзогенную H_2O_2 в течение 1 ч, по сравнению с бледными талломами (рис. 4а).

Анализ интенсивности дыхательной активности талломов лишайника *C. islandica* показал, что скорость дыхания меланизированных талломов *C. islandica* почти вдвое ниже по сравнению со скоростью дыхания бледных талломов (рис. 4б).

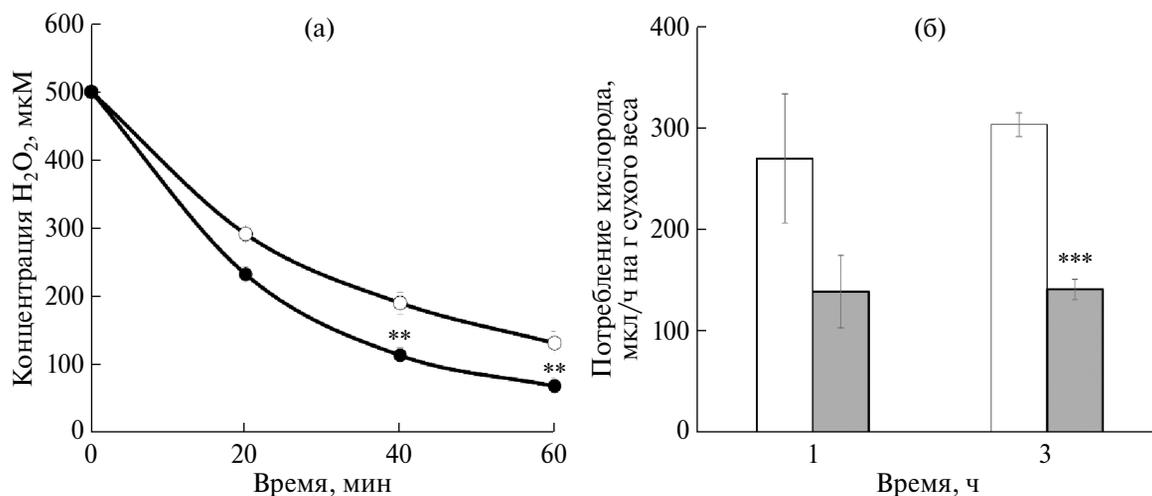


Рис. 4. Окислительно-восстановительная активность (а) и интенсивность дыхания талломов лишайника *C. islandica* (б). (а) – деградация экзогенной 500 мкМ H_2O_2 бледными (белые кружки) и меланизированными (черные кружки) талломами *C. islandica*. (б) – интенсивность дыхания бледных (белые столбцы) и меланизированных талломов *C. islandica* (черные столбцы). Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA при $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

ОБСУЖДЕНИЕ

Лишайники — это экстремофильные организмы, успешно выживающие в самых неблагоприятных условиях среды [19]. В ответ на стрессовое воздействие, связанное с интенсивной солнечной радиацией и УФ-излучением, талломы лишайника *C. islandica* приобретают темно-окрашенную пигментацию, обусловленную синтезом пигмента меланина в верхнем кортексе талломов. Меланины — универсальные пигменты, характерные многим организмам. На сегодняшний день большинство работ, посвященных изучению морфологии и свойств меланинов, выполнены на патогенных грибах [20–22], бактериях [23, 24], меланосомах человека [25, 26]. Ранее нами были проанализированы физико-химические свойства меланинов, экстрагированных из лишайников *C. islandica*, *Lobaria pulmonaria* и *Leptogium furfuraceum* [27–29]. Несмотря на то, что роль меланизации в защите лишайников от солнечной радиации широко описана в литературе [30, 31], существуют лишь единичные работы, посвященные исследованию архитектуры меланинового слоя в талломах лишайников *in situ* [7, 8]. В настоящей работе выявлены особенности морфологии и топографии поверхности корового слоя меланизированного таллома лишайника *C. islandica*. Так, меланизированные талломы *C. islandica* характеризовались потемнением поверхности верхнего кортекса и характерным для меланинов окрашиванием (рис. 1), а также утолщением клеточных стенок и увеличением межгифового пространства верхнего корового слоя, визуализированного на поперечных срезах талломов (рис. 2). Ранее мы показали, что меланизация лишайника *L. pulmonaria* сопровождается увеличением межгифового пространства и накоплением меланиноподобных гранул [7]. Можно полагать, что увеличение межгифового пространства верхнего корового слоя талломов является характерной морфологической особенностью лишайников при УФ-индуцированной меланизации. Нами также было показано, что меланизация талломов лишайника *L. pulmonaria* приводила не только к морфологическим изменениям, но и к изменению физических свойств талломов, обусловленному образованием меланиновых комплексов [8]. В настоящей работе с помощью АСМ была охарактеризована топография и проанализированы наномеханические свойства верхнего корового слоя поперечных срезов лишайника *C. islandica*. Обнаружено, что в меланизированных талломах *C. islandica* происходит повышение адгезии корового слоя, а параметры жесткости значительно снижаются по сравнению с таковыми в бледных талломах (рис. 3). Это свидетельствует о высокой хелатирующей способности меланина и возможном образовании

сложных ассоциатов меланина с полисахаридами и белками клеточных стенок. По предварительным данным, процентная доля полисахаридов, в частности лихенина и изолихенина, в меланиновых ассоциатах у *C. islandica* выше, чем у *L. pulmonaria*, что может повышать сорбционные свойства и оказывать влияние на топографические характеристики меланизированного верхнего корового слоя талломов (данные не опубликованы). Таким образом, изменения наномеханических показателей талломов *C. islandica* при меланизации подтверждают изменение топографии меланизированных талломов лишайника на наноуровне.

Можно полагать, что такие значительные изменения морфологии и топографии таллома оказывают влияние на физиолого-биохимическое состояние лишайника. Данное предположение подтвердилось данными об антиоксидантной и дыхательной активности. Было показано, что меланизация сопровождается повышением антиоксидантной активности таллома, о чем свидетельствует эффективная деградация экзогенной H_2O_2 меланизированными талломами *C. islandica*. Эти данные подтверждают продемонстрированную нами ранее высокую антиоксидантную активность меланина, экстрагированного из *C. islandica* [27]. Меланизация талломов лишайников может снижать эффективность основного цитохром-зависимого пути дыхания. При сравнительном анализе интенсивности дыхания бледных и меланизированных талломов *C. islandica* выявлено значительное снижение общей дыхательной активности у пигментированных талломов (рис. 4). Это может быть обусловлено изменением под действием меланина физико-химических свойств клеточной поверхности талломов, а также следствием полупроводниковой природы меланина [32] и перераспределением потока электронов, приводящего к снижению эффективности энергопроизводящих метаболических путей. Снижение дыхательной активности может свидетельствовать о снижении метаболической активности микробонта в меланизированном талломе. Известно, что в свободноживущих грибах содержание меланина отрицательно коррелирует с ростом биомассы гиф [33]. Эти данные подтверждают гипотезу о существовании “физиологического компромисса” между биосинтезом меланина и клеточным метаболизмом [33].

Таким образом, полученные нами результаты расширяют представление о барьерной функции меланинового слоя верхнего кортекса талломов лишайников. Изменения в микроструктуре и топографии верхнего кортекса и последующие изменения физиолого-биохимического состояния таллома при меланизации свидетельствуют о разнообразии меланин-опо-

средованных механизмов защиты лишайника *C. islandica* от интенсивного проникновения и токсического действия интенсивной солнечной радиации.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра Казанского научного центра Российской академии наук, а также при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-14-00327 (для А.Д. и Ф.М., анализ морфологии и топографии меланизированных талломов).

Настоящая статья не содержит результатов экспериментов с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eisenreich W., Knispel N., Beck A. Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens // *Phytochem. Rev.* 2011. V. 10. P. 445. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9215-3>
2. Armstrong R.A. Adaptation of lichens to extreme conditions. In: eds. Shukla V., Kumar S., Kumar N. *Plant adaptation strategies in changing environment*. Singapore: Springer. 2017. P. 27. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6744-0_1
3. Dadachova E., Bryan R.A., Howell R.C., Schweitzer A.D., Aisen P., Nosanchuk J.D., Casadevall A. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement // *Pigm. Cell Melanoma Res.* 2008. V. 21. P. 192. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2007.00430.x>
4. Huijser A., Pezzella A., Sundström V. Functionality of epidermal melanin pigments: current knowledge on UV-dissipative mechanisms and research perspectives // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. V. 13. P. 9119. <https://doi.org/10.1039/C1CP20131J>
5. Schweitzer A.D., Revskaya E., Chu P., Pazo V., Friedman M., Nosanchuk J.D., Cahill S., Frases S., Casadevall A., Dadachova E. Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010. V. 78. P. 1494. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.02.020>
6. Solhaug K.A., Gauslaa Y., Nybakken L., Bilger W. UV-induction of sun-screening pigments in lichens // *New Phytol.* 2003. V. 158. P. 91. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00708.x>
7. Daminova A.G., Rogov A.M., Rassabina A.E., Beckett R.P., Minibayeva F.V. Effect of melanization on thallus microstructure in the lichen *Lobaria pulmonaria* // *J. Fungi.* 2022. V. 8. P. 791. <https://doi.org/10.3390/jof8080791>
8. Daminova A.G., Rassabina A.E., Khabibrakhmanova V.R., Beckett R.P., Minibayeva F.V. Topography of UV-melanized thalli of *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. // *Plants.* 2023. V. 12. P. 2627. <https://doi.org/10.3390/plants12142627>
9. Honegger R., Haisch A. Immunocytochemical location of the (1→3) (1→4)-β-glucan lichenin in the lichen-forming ascomycete *Cetraria islandica* (Icelandic moss) // *New Phytol.* 2001. V. 150. P. 739. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00122.x>
10. Nybakken L., Solhaug K.A., Bilger W., Gauslaa Y. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats // *Oecologia.* 2004. V. 140. P. 211. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1583-6>
11. Solhaug K.A., Eiterjord G., Løken M.H., Gauslaa Y. Non-photochemical quenching may contribute to the dominance of the pale mat-forming lichen *Cladonia stellaris* over the sympatric melanic *Cetraria islandica* // *Oecologia.* 2024. V. 204. P. 187.
12. Youngchim S., Nosanchuk J.D., Pornsuwan S., Kajibwara S., Vanittanakom N. The role of L-DOPA on melanization and mycelial production in *Malassezia furfur* // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063764>
13. Rejniak J. New method of melanin staining in histological preparations // *Pathol. Pol.* 1956. V. 7. P. 101.
14. Lillie R.D. A Nile blue staining technic for the differentiation of melanin and lipofuscins // *Stain Technol.* 1956. V. 31. P. 151.
15. Викторова Л.В., Галеева Е.И., Минибаева Ф.В. Лакказы и тирозиназы в талломах лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. // *Экобиотех.* 2020. Т. 3. С. 220. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-220-228>
16. Bellincampi D., Dipperro N., Salvi G., Gervcone F., De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 1379. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
17. Валитова Ю.Н., Хабибрахманова В.Р., Гурьянов О.П., Уваева В.Л., Хайруллина А.Ф., Рахматуллина Д.Ф., Галеева Е.И., Трифонова Т.В., Викторова Л.В., Минибаева Ф.В. Изменение липидного состава лишайника *Peltigera canina* при действии повышенной температуры // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2023. Т. 3. С. 532. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-4-532-544>
18. Słominski A., Moellmann G., Kuklinska E., Bomirski A., Pawelek J. Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrates of the melanogenic pathway, L-tyrosine and L-dopa // *J. Cell Sci.* 1988. V. 89. P. 287. <https://doi.org/10.1242/jcs.89.3.287>
19. Nash T.H. *Lichen Biology*. 2nd Edition, Cambridge: Cambridge University Press. 2008. 502 p. <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511790478>

20. *Butler M.J., Day A.W.* Fungal melanins: A review // *Can. J. Microbiol.* 1998. V. 44. P. 1115. <https://doi.org/10.1139/w98-119>
21. *Jacobson E.S.* Pathogenic roles for fungal melanins // *Clin. Microbiol. Rev.* 2000. V. 13. P. 708. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.708>
22. *Pacelli C., Bryan R.A., Onofri S., Selbmann L., Zucconi L., Shuryak I., Dadachova E.* The effect of protracted X-ray exposure on cell survival and metabolic activity of fast and slow growing fungi capable of melanogenesis // *Environ. Microbiol. Rep.* 2018. V. 10. P. 255. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12632>
23. *Pavan M.E., López N.I., Pettinari M.J.* Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. P. 1357. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10245-y>
24. *Choi K.-Y.* Bioprocess of microbial melanin production and isolation // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.765110>
25. *Raposo G., Marks M.S.* Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. P. 786. <https://doi.org/10.1038/nrm2258>
26. *Yoshikawa-Murakami C., Mizutani Y., Ryu A., Naru E., Teramura T., Homma Y., Fukuda M.* A novel method for visualizing melanosome and melanin distribution in human skin tissues // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 8514. <https://doi.org/10.3390/ijms21228514>
27. *Рассабина А.Е., Гурьянов О.П., Бекетт Р.П., Мунисбаева Ф.В.* Меланин лишайников *Cetraria islandica* и *Pseudevernia furfuracea*: особенности строения и физико-химические свойства // *Биохимия.* 2020. Т. 85. С. 729.
28. *Rassabina A.E., Khabibrakhmanova V.R., Babaev V.M., Daminova A.G., Minibayeva F.V.* Melanins from the lichens *Lobaria pulmonaria* and *Lobaria retigera* as ecofriendly adsorbents of synthetic dyes // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 15605. <https://doi.org/10.3390/ijms232415605>
29. *Хабибрахманова В.Р., Рассабина А.Е., Хайруллина А.Ф., Мунисбаева Ф.В.* Физико-химические характеристики и антиоксидантные свойства меланинов, выделенных из лишайника *Leptogium furfuraceum* (Harm.) // *Химия растительного сырья.* 2022. Т. 4. С. 115.
30. *Gauslaa Y., Alam M.A., Lucas P.L., Chowdhury D.P., Solhaug K.A.* Fungal tissue per se is stronger as a UV-B screen than secondary fungal extrolites in *Lobaria pulmonaria* // *Fungal Ecol.* 2017. V. 26. P. 109. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.01.005>
31. *Mafole T.C., Solhaug K.A., Minibayeva F.V., Beckett R.P.* Occurrence and possible roles of melanic pigments in lichenized ascomycetes // *Fungal Biol. Rev.* 2019. V. 33. P. 159. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.002>
32. *Mostert A.B., Powell B.J., Pratt F.L., Hanson G.R., Sarina T., Gentle I.R., Meredith P.* Role of semiconductivity and ion transport in the electrical conduction of melanin // *PNAS.* 2012. V. 109. P. 8943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119948109>
33. *Siletti C.E., Zeiner C.A., Bhatnagar J.M.* Distributions of fungal melanin across species and soils // *Soil Biol. Biochem.* 2017. V. 113. P. 285. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.05.030>

УДК 581.1

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ КОЖУРЫ ПЛОДОВ ЛИМОНА СОРТА ТАШКЕНТСКИЙ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ЗАКРЫТОМ ГРУНТЕ В РАЗЛИЧНЫХ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОНАХ

© 2024 г. Н. В. Иванов^{a, *}, Д. С. Аникина^a, А. В. Навров^b

^aФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия
имени К.А. Тимирязева”, Москва, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский
институт агрохимии имени Д.Н. Прянишникова”, Москва, Россия

*e-mail: nik.love.world@gmail.com

Поступила в редакцию 01.10.2023 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 21.03.2024 г.

Проведен сравнительный анализ содержания и качественного состава эфирных масел, полученных из кожуры лимонов (*Citrus × limon* (L.) Osbeck) сорта Ташкентский методом гидродистилляции с использованием модифицированного приемника А.С. Гинзберга. Соблюдался принцип единственного различия, который состоял в выращивании плодов в закрытом грунте различных природно-климатических зон – г. Москва и г. Уфа (Республика Башкортостан). При этом пренебрегалась незначительная вариабельность содержания легкогидролизуемого азота, подвижных форм фосфора и калия в высокоплодородных почвогрунтах теплиц, относящихся к группе с высокой и повышенной обеспеченностью. Так как потенциальный урожай растений при оптимальных параметрах микроклимата зависит от поступления фотосинтетически активной радиации (ФАР) при ясном небе в течение вегетационного периода, то было выявлено влияние интенсивности светового потока на содержание компонентов в эфирных маслах цитрусовых, произрастающих внутри круглогодичных двускатных теплиц с естественным освещением и близкоширотным направлением. Высокое суммарное содержание эфирного масла наблюдалось в кожуре плодов, выращиваемых в тепличных условиях г. Уфа. Месторасположение культивационного сооружения отличалось высокой величиной ФАР (при ясном небе), что повлияло на химический состав цитрусовых. Сравнительный анализ состава эфирных масел, проведенный методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией, показал отсутствие значимых изменений высокого уровня концентрации D-лимонена в кожуре лимонов, выращиваемых в закрытом грунте различных природно-климатических зон. Содержание монотерпеновых углеводов и эфиров преобладало в кожуре сорта Ташкентский, произрастающего в теплице УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна (г. Москва). Содержание сесквитерпеновых углеводов, спиртов, альдегидов преобладало в кожуре сорта Ташкентский, произрастающего в теплице учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” (г. Уфа). Полученные данные объясняются тем, что сортовые особенности и условия выращивания влияют на количественный и качественный состав эфирных масел.

Ключевые слова: *Citrus × limon*, кожура лимона, почвогрунт, эфирные масла

DOI: 10.31857/S0015330324040059, EDN: MNYCWB

ВВЕДЕНИЕ

Плоды цитрусовых на сегодняшний день являются наиболее активно потребляемыми фруктами. Они отличаются множеством преимуществ, включая пищевую ценность и доступ-

ность. В составе кожуры и мякоти преобладает широкий спектр химических веществ, таких как органические кислоты, пигменты, витамины, углеводы, кумарины, тритерпеноиды, стероиды, фенольные и азотистые соединения, эфирные масла, ферменты, минеральные элементы, которые придают цитрусовым характерный аромат и вкус, а также обладают биологической актив-

Сокращения: ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектрометрией, ФАР – фотосинтетически активная радиация.

ностью [1, 2]. Концентрация биохимических компонентов может меняться в широком диапазоне в зависимости от почвенно-климатических условий произрастания цитрусовых, выбора сорта, продолжительности и условий хранения плодов. В последние годы активно изучается химический состав эфирных масел кожуры лимона (*Citrus × limon* (L.) *Osbeck*), что обусловлено их биологическими свойствами, такими как антифунгальная [3], антимикробная [4], антиоксидантная [5], противовоспалительная [6], антидепрессантная [7], противораковая [8] и иммуномодулирующая [9] активности. Эфирные масла цитрусовых применяют при создании натуральных духов, используют как ароматизирующий компонент в пищевой, фармацевтической и косметической отраслях.

Кожа лимона составляет 30–40% от массы плода. С производственной и потребительской точки зрения кожа является отходом, однако с позиции биоэкономики – это ценный источник биологически активных соединений. Компонентный состав эфирных масел кожуры лимона изучен достаточно подробно. К преобладающим соединениям можно отнести монотерпены (>90%), кислородсодержащие производные монотерпенов и сесквитерпены. Монотерпены и сесквитерпены представляют собой ненасыщенные углеводороды, а кислородсодержащие производные монотерпенов – различные классы химических веществ: сложные эфиры, спирты, альдегиды, кетоны, кислоты [10]. Следует отметить, что терпеновые углеводороды при контакте с кислородом воздуха или нагревании могут разлагаться с образованием соединений, обладающих неприятным запахом. Основной вклад в состав эфирного масла лимона вносят кислородсодержащие производные монотерпенов, так как влияют на его вкус и аромат [11].

Сравнивать состав эфирных масел лимона, содержащих большое разнообразие химических соединений, сложно из-за влияния многих факторов, таких как: климатические условия, хемотип и генотип растения, агрохимические особенности выращивания, сезон сбора урожая, выбранный способ и продолжительность экстрагирования кожуры. При этом качество эфирного масла независимо от происхождения растительного сырья определяется устойчивостью химического состава.

Одним из существенных приемов интенсификации цитрусоводства является выращивание растений в культивационных сооружениях защищенного грунта, где создается определенный микроклимат в соответствии с биологическими требованиями культур. При этом для нормального роста и развития лимонов в круглогодичных двускатных теплицах с естественным освещением

требуется экваториальная ориентация продольной оси конструкции, так как расположение с востока на запад позволяет проникнуть большему количеству прямой солнечной радиации [12, 13].

Цель данной работы – определение качественного и количественного состава эфирного масла кожуры лимонов одного сорта, выращенного в различных природно-климатических зонах (г. Москва и г. Уфа (Республика Башкортостан)) в условиях закрытого грунта – круглогодичных двускатных теплиц с естественным освещением и близкоширотным направлением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Работу выполняли на плодах растений лимона (*Citrus × limon* (L.) *Osbeck*) сорта Ташкентский, выращенных в условиях закрытого грунта на базе учебно-научно-производственного центра садоводства и овощеводства имени В.И. Эдельштейна (г. Москва) и учебно-опытного хозяйства Государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения “Уфимский лесотехнический техникум” (г. Уфа, Республика Башкортостан).

Растение *Citrus × limon* (L.) *Osbeck* относится к семейству Rutaceae. Сорт Ташкентский был получен в результате семенного размножения сорта Мейер. Растение представляет собой плодовое дерево высотой до 3.5 м с вечнозелеными листьями и густой, пониклой кроной диаметром до 3 м. Характер ветвления – близкий к прямому. Крупные, ярко-зеленые, блестящие листья характеризуются овальной формой и остроконечным верхом. Листовая пластинка достигает примерно 7–9 см в длину [14]. Цветки лимона сорта Ташкентский бокаловидные, ароматные, собраны в соцветие. Лепестки окрашены с внутренней стороны в кремово-белый цвет, а с внешней – в бледно-розовый. Плод среднего размера (шириной от 50 до 60 мм, высотой от 70 до 80 мм), яйцевидной формы с ярко-желтой гладкой и блестящей кожицей, содержит сочную мякоть, отличается кисло-сладким вкусом и тонким запахом мандарина. Основное назначение сорта – десертно-столовый [15].

Общая характеристика микроклимата теплиц. На базе учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” эксплуатируется остекленная теплица, представляющая собой наземную конструкцию блочного типа с двускатным перекрытием крыши. Микроклимат внутри круглогодичной теплицы контролировали несколько раз в день. Температуру и относительную влажность воздуха измеряли психрометром аспирационным МВ-4М (АО Сафоновский завод “Гидрометприбор”, Россия),

температуру почвы на глубине 10 см – коленчатым метеорологическим термометром Савинова ТМ-5 (ОАО “Термоприбор”, Россия).

На базе УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна эксплуатируется остекленная теплица, представляющая собой наземную конструкцию рамного типа с двускатным перекрытием крыши. Микроклимат внутри круглогодичной теплицы контролировали несколько раз в день. Температуру и относительную влажность воздуха измеряли комбинированным прибором Testo 608-N1 (Testo Instruments Co. Ltd., КНР), температуру почвы на глубине 10 см – коленчатым метеорологическим термометром Савинова ТМ-5 (ОАО “Термоприбор”, Россия).

В зимних теплицах, где выращивали районированный в Узбекистане сорт лимона Ташкентский, поддерживали следующие климатические условия: температура воздуха и почвы 18°–30°C, влажность воздуха и почвы 70–80%. Параметры микроклимата приведены в таблице 1.

Общая характеристика почвогрунта. Анализ почвогрунтов проводили в испытательном

центре почвенно-экологических исследований (РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева). Агрохимическое обследование почвогрунтов проводили 1 раз в 4 недели. Отбирали смешанные образцы с пахотного слоя (0–35 см). Гидролитическую кислотность и рН солевой вытяжки определяли с помощью лабораторного рН-метра S20-K SevenEasy (Mettler Toledo, Швейцария), согласно ГОСТ 26212-2021 и 26483-85. Сумму поглощенных оснований определяли по Каппену (ГОСТ 27821-2020). Содержание подвижных соединений фосфора и калия в грунте определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ООО “ОКБ СПЕКТР”, Россия) и пламенного фотометра ПФА-378 (ООО “ЮНИКО-СИС”, Россия) по методу Чирикова (ГОСТ 26204-91). Содержание гумуса определяли по Тюрину (ГОСТ 26213-91), а содержание легкогидролизуемого азота – по Тюрину и Кононовой [16].

Экстракция эфирных масел. Сбор урожая проводили в период созревания (первая декада ноября 2022 г.) с учетом феноритмов развития данного сорта растения 30–31-летнего возраста. Количественное содержание и качественный

Таблица 1. Параметры микроклимата теплиц

Учебно-опытное хозяйство ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” (г. Уфа, Республика Башкортостан)						
Параметры	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
Температура воздуха, °С	21.2 ± 0.1	23.1 ± 0.1	23.5 ± 0.1	25.0 ± 0.1	24.8 ± 0.1	26.3 ± 0.1
Температура почвы, °С	20.0 ± 0.2	20.0 ± 0.2	21.0 ± 0.2	21.0 ± 0.2	22.0 ± 0.2	22.5 ± 0.2
Влажность воздуха, %	74 ± 2	74 ± 2	76 ± 2	76 ± 2	76 ± 2	78 ± 2
Параметры	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь
Температура воздуха, °С	23.2 ± 0.1	23.0 ± 0.1	21.1 ± 0.1	21.0 ± 0.1	21.3 ± 0.1	21.1 ± 0.1
Температура почвы, °С	21.0 ± 0.2	21.0 ± 0.2	20.5 ± 0.2	20.5 ± 0.2	20.0 ± 0.2	20.0 ± 0.2
Влажность воздуха, %	77 ± 2	77 ± 2	75 ± 2	75 ± 2	74 ± 2	74 ± 2
УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна (г. Москва)						
Параметры	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
Температура воздуха, °С	19.8 ± 0.1	21.1 ± 0.1	21.8 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.8 ± 0.1	24.6 ± 0.1
Температура почвы, °С	19.0 ± 0.2	19.5 ± 0.2	19.5 ± 0.2	20.0 ± 0.2	20.0 ± 0.2	21.5 ± 0.2
Влажность воздуха, %	72 ± 2	73 ± 2	73 ± 2	74 ± 2	75 ± 2	75 ± 2
Параметры	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь
Температура воздуха, °С	25.0 ± 0.1	23.2 ± 0.1	20.9 ± 0.1	19.9 ± 0.1	19.7 ± 0.1	19.7 ± 0.1
Температура почвы, °С	21.5 ± 0.2	21.0 ± 0.2	19.5 ± 0.2	19.5 ± 0.2	19.0 ± 0.2	19.0 ± 0.2
Влажность воздуха, %	75 ± 2	77 ± 2	75 ± 2	73 ± 2	72 ± 2	72 ± 2

состав эфирных масел определяли на кафедре химии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Получение и количественное определение эфирного масла из кожуры лимонов осуществляли методом гидродистилляции с использованием модифицированного приемника А.С. Гинзберга [17]. Полученный объем эфирного масла пересчитывали на 100 г свежего сырья.

Качественный состав эфирного масла устанавливали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ/МС) после экстракции полученного дистиллята гексаном на аналитическом комплексе CLARUS 600 (Perkin Elmer Life And Analytical Sciences, Inc., США), согласно ГОСТ ISO 7609-2014. Использовали колонку "Elit 5-MS" (30 м × 0.32 мм × 0.5 мк); газ-носитель гелий – 1 мл/мин. Объем пробы составил 0.5 мкл, разделение потока 1/50; температурный режим: 60°C – 5 мин, далее 3°C/мин до 195°C (изотерма 15 мин). Режим масс-детектора: E⁺ 70 эВ, температура интерфейса – 210°C, температура источника – 180°C. Идентификацию хроматографических пиков проводили посредством сравнения получаемых масс-спектров с данными масс-спектрометрической библиотеки NIST/ERA/NIH (версия 2-2020) и библиотеки RI, в основу которой положен метод эллипсоидного распределения n-алканов в режиме произвольного программирования температуры анализа [18]. В качестве внутреннего стандарта использовали тридекан (Supelco, США).

Статистический анализ. Пробы плодов от однолетних деревьев, выращиваемых в Москве и Уфе, отбирали одновременно в 1 день через определенные промежутки времени (каждые 2 дня). Опыты проводились тремя сериями по два параллельных испытания в 2-кратной повторности. За окончательный результат анализа принималось среднее арифметическое значение компонента (%) для всех серий. Статистическая обработка данных проводилась с использованием дисперсионного анализа и критерия Стьюдента. Критерий достоверности составил 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Потенциальный урожай при оптимальных значениях параметров микроклимата теплиц обеспечивается поступлением фотосинтетически активной радиации (ФАР) при ясном небе в течение вегетационного периода растений. С использованием данных (<https://power.larc.nasa.gov/>) дана оценка суммарной ФАР (рис. 1). В условиях закрытого грунта цитрусовые растения были высажены в почвогрунт в шахматном порядке по схеме 3 × 3 м. Почвогрунт представлял собой серые лесные глинистые почвы. Результаты проведенного исследования почвогрунтов теплиц представлены в таблице 2.

Исходя из полученных данных (табл. 2), можно заключить, что реакция солевой вытяжки в почвогрунтах нейтральная (рНКСI > 6.0).

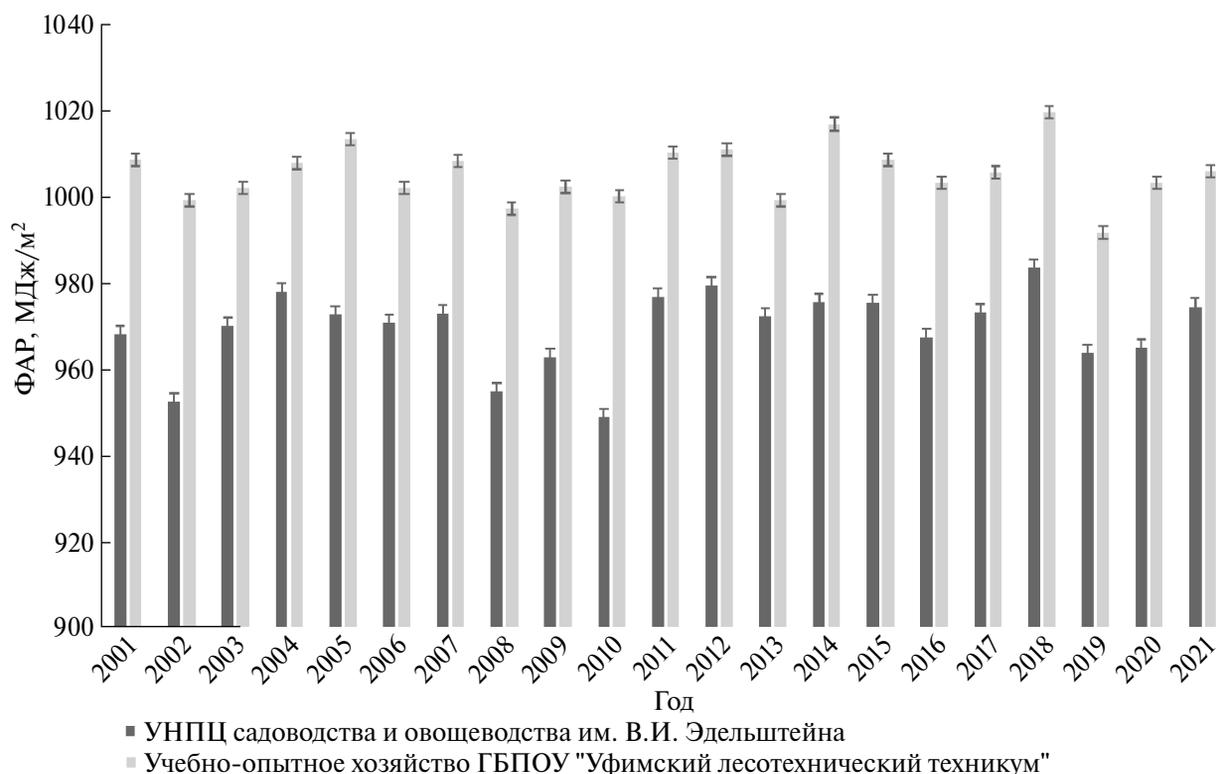


Рис. 1. Суммарная фотосинтетически активная радиация при ясном небе в течение вегетационного периода, МДж/м²

Таблица 2. Агрохимические свойства почвогрунтов

Показатель	Почвогрунт теплицы учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” (г. Уфа, Республика Башкортостан)	Почвогрунт теплицы УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна (г. Москва)
pH _{KCl}	6.91 ± 0.01	6.17 ± 0.01
Hг, мг-экв/100 г	1.37 ± 0.08	0.64 ± 0.03
S, ммоль/100 г	60.0 ± 6.0	49.1 ± 4.9
Гумус, %	10.5 ± 0.5	7.6 ± 0.3
P ₂ O ₅ , мг/кг	188.0 ± 18.8	138.0 ± 13.7
K ₂ O, мг/кг	135.2 ± 13.5	101.0 ± 7.6
N _{д.г.} , мг/кг	93.0 ± 4.7	63.3 ± 3.7

Почвогрунты характеризуются низкой гидролитической кислотностью (Hг < 2.0 мг-экв/100 г) и очень высокой суммой поглощенных оснований (S > 30.0 ммоль/100 г). Как следствие, почвогрунты не нуждаются в известковании, и отличаются высокой гумусированностью (6.0–10.0%). По содержанию легкогидролизуемого азота, подвижных форм фосфора и калия почвогрунты теплицы учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” относятся к группе с высокой обеспеченностью, а почвогрунты теплицы УНПЦ садоводства

и овощеводства им. В.И. Эдельштейна – к группе с повышенной обеспеченностью [19].

Количественное содержание эфирного масла кожуры лимонов, выращенных в теплицах на базе УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна (г. Москва) и учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” (г. Уфа, Республика Башкортостан), составило 0.3330 ± 0.0050 и 0.6600 ± 0.009 мг/100 г сырой массы соответственно. Результаты ГХ-МС анализа эфирного масла приведены в таблице 3 и на рис. 2 и 3.

Таблица 3. Компонентный состав эфирных масел из кожуры лимонов (*Citrus × limon* (L.) *Osbeck*) сорта Ташкентский, мг/100 г сырой массы

Компонент	Растения выращены в теплице учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” (г. Уфа, Республика Башкортостан)	Растения выращены в теплице УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна (г. Москва)
D-лимонен	0.2597 ± 0.0039	0.2467 ± 0.0037
Остальные монотерпеновые углеводороды		
β-туйен	0.0009 ± 0.0000	0.0015 ± 0.0000
α-пинен	0.0027 ± 0.0000	0.0044 ± 0.0001
β-пинен	0.0022 ± 0.0000	0.0031 ± 0.0000
Мирцен	0.0052 ± 0.0001	0.0053 ± 0.0001
α-фелландрен	0.0001 ± 0.0000	–
β-фелландрен	–	0.0004 ± 0.0000
α-терпинен	0.0007 ± 0.0000	0.0008 ± 0.0000
n-кумен	0.0077 ± 0.0001	0.0054 ± 0.0001
Сабинен	0	0.0010 ± 0.0000
транс-β-оцимен	–	–
цис-β-оцимен	0.0189 ± 0.0003	0
γ-терпинен	0.0014 ± 0.0000	0.0294 ± 0.0004
Терпинолен	0.0006 ± 0.0000	0.0018 ± 0.0000

Таблица 3. Окончание

Компонент	Растения выращены в теплице учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” (г. Уфа, Республика Башкортостан)	Растения выращены в теплице УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна (г. Москва)
Сесквитерпеновые углеводороды		
α -кариофиллен	—	—
β -кариофиллен	0.0002 ± 0.0000	—
β -бисаболен	0.0003 ± 0.0000	0.0009 ± 0.0000
Транс- α -бергамотен	0.0018 ± 0.0000	—
α -бергамотен	—	0.0005 ± 0.0000
Цис- α -бергамотен	0.0005 ± 0.0000	—
γ -гурджунен	—	—
Спирты		
Терпинен-4-ол	0.0010 ± 0.0000	0.0006 ± 0.0000
α -терпинеол	0.0021 ± 0.0000	0.0018 ± 0.0000
Карвеол	0.0002 ± 0.0000	0.0003 ± 0.0000
β -цитранеллол	0.0002 ± 0.0000	—
1-ноналол	0.0004 ± 0.0000	—
<i>p</i> -мента-2,8-диен-1-ол	0.0002 ± 0.0000	—
Эфиры		
Формиат линалила	—	0.0033 ± 0.0000
β -терпинил ацетат	—	—
β -терпинил изо-валерат	—	0.0009 ± 0.0000
4-терпинил ацетат	—	—
Нерил <i>изо</i> -валерат	—	0.0001 ± 0.0000
Изовалерат линалила	0.0001 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0000
Геранил изо-валерат	—	0.0002 ± 0.0000
Геранил пропионат	—	0.0002 ± 0.0000
1,8-цинеол	—	0.0028 ± 0.0000
Линалил ацетат	0.0026 ± 0.0000	—
Валерат линалила	0.0006 ± 0.0000	—
γ -терпинил ацетат	0.0001 ± 0.0000	—
Альдегиды		
Октаналь	—	0
Нонаналь	0.0001 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0000
Периллал	—	—
Деканаль	0.0001 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0000
Цитраль	0.0014 ± 0.0000	0.0006 ± 0.0000
Цитронеллаль	0.0014 ± 0.0000	0.0009 ± 0.0000
Неидентифицированные компоненты		
—	0.0389 ± 0.0006	0.0197 ± 0.0003

Сравнительный анализ состава эфирного масла кожуры лимонов сорта Ташкентский, выращиваемых в закрытом грунте различных природно-климатических зон, показал отсутствие значимых различий по содержанию D-лимонена. Концентрация монотерпеновых углеводородов и эфиров преобладала в кожуре цитрусовых, произрастающих в теплице УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна. Концен-

трация сесквитерпеновых углеводородов, спиртов, альдегидов преобладала в кожуре цитрусовых, произрастающих в теплице учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум”. Суммарное содержание эфирного масла почти в 2 раза было выше в кожуре лимонов, выращиваемых в условиях закрытого грунта в г. Уфа, по сравнению с лимонами, выращиваемыми в условиях закрытого грунта в г. Москва.

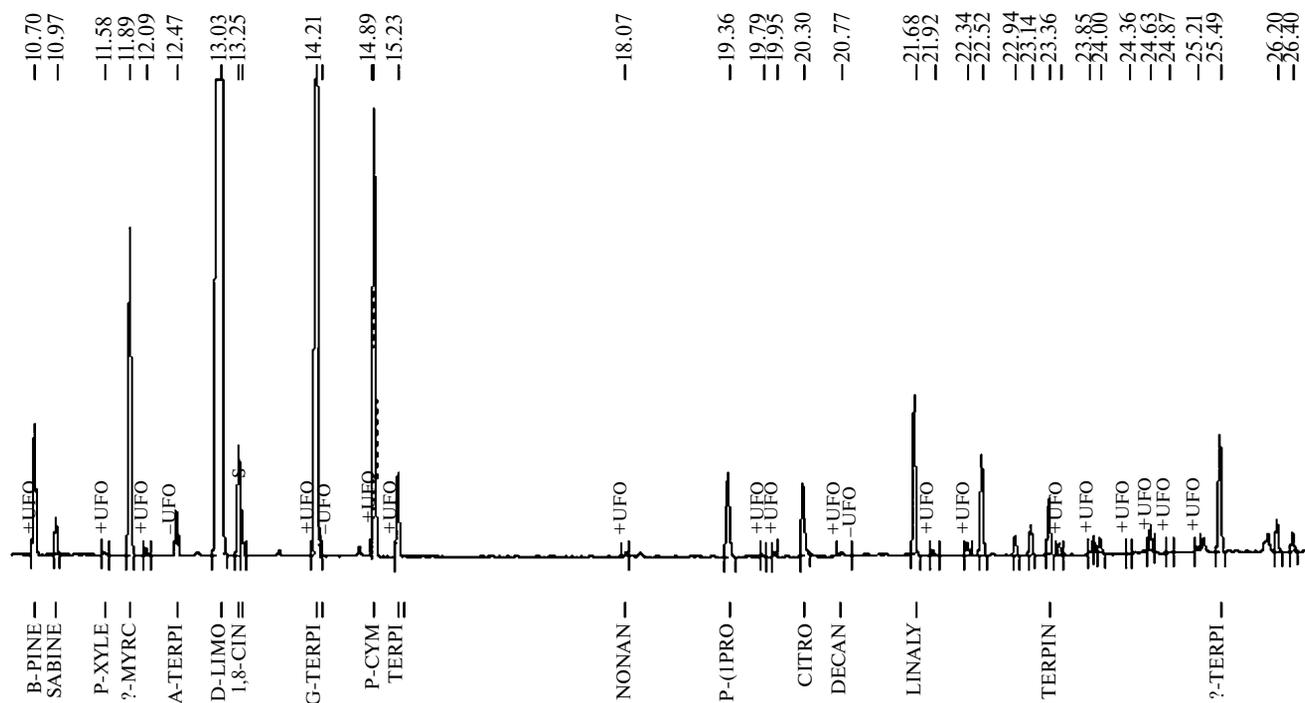


Рис. 2. Хроматограмма эфирного масла кожуры лимона сорта Ташкентский, выращенного в теплице учебно-опытного хозяйства ГБПОУ «Уфимский лесотехнический техникум» (г. Уфа, Республика Башкортостан).

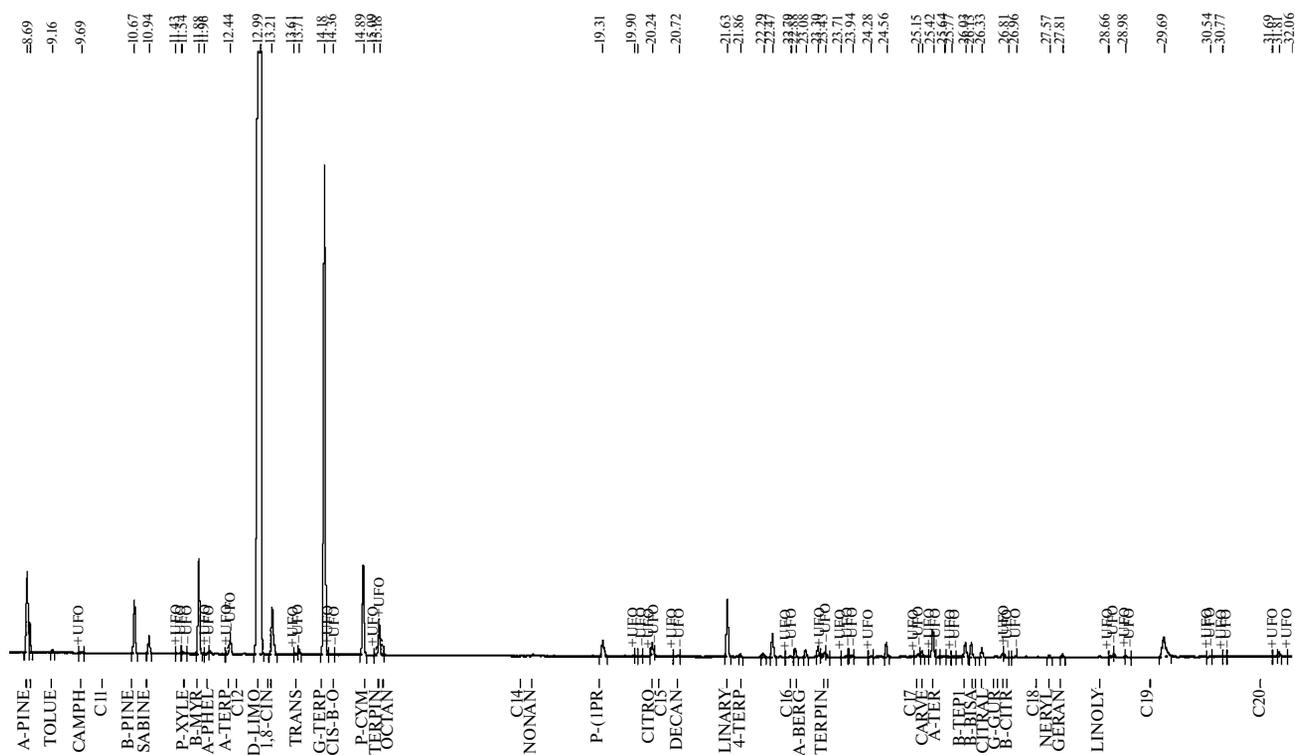


Рис. 3. Хроматограмма эфирного масла кожуры лимона сорта Ташкентский, выращенного в теплице УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна (г. Москва).

ОБСУЖДЕНИЕ

Лимон – субтропическая культура, которая относится к вечнозеленым плодовым деревьям с ремонтантным типом плодоношения, зависящим от факторов окружающей среды [20]. Влажный субтропический климат характеризуется следующими параметрами: средняя годовая температура на уровне моря колеблется от 12.9° до 14.1°C, средняя температура самых жарких месяцев (июль, август) составляет около 23°C, при этом максимум может достигать до 39°C, средняя относительная влажность воздуха составляет 80% [21, 22].

Для успешного прохождения растениями лимона фенологических фаз развития, в теплицах необходимо поддерживать оптимальные температуру, влажность воздуха и почвы. Рост побегов происходит при температуре воздуха и почвы 9°–12°C, бутонизация – 19°–20°C, цветение и плодоношение – 20°–25°C. Рекомендуемый уровень влажности воздуха и почвы составляет от 70 до 80% [23]. Микроклимат внутри круглогодичных культивационных сооружений защищенного грунта регулировался отопительными системами и дождевальными установками. Также регулярно вносились органические и минеральные удобрения, осуществлялись биологические методы борьбы с вредителями. Поддерживаемые условия в теплицах были максимально приближены к субтропикам, что удовлетворяло биологические требования цитрусовых культур [24].

Для растений наиболее важным фактором являются ресурсы солнечной радиации. Оценка интенсивности светового потока в период вегетации обычно проводится по распределению ФАР, которая при ясном небе является одним из важнейших факторов продуктивности культур [25]. Для теплицы учебно-опытного хозяйства ГБПОУ “Уфимский лесотехнический техникум” ФАР за последние 20 лет превышает величину ФАР для теплицы УНПЦ садоводства и овощеводства им. В.И. Эдельштейна. Различия являются статистически достоверными (рис. 1).

По результатам периодических агрохимических анализов рассчитываются дозы удобрений, которые вносятся различными приемами. Гранулометрический состав и химическая характеристика почвогрунтов теплиц максимально приближены к условиям естественного места произрастания цитрусовых растений [26, 27]. Несмотря на определенные различия между агрохимическими свойствами почвогрунтов теплиц в различных природно-климатических зонах, варибельность содержания питательных веществ незначительна, так как встречаются два уровня обеспеченности (повышенный и высокий), которые исключают целесообразность

в последующем внесении удобрений [28]. Существенных различий между агрохимическими свойствами почвогрунтов теплиц, находящихся в различных природно-климатических зонах, не обнаружено. Данные лабораторного исследования говорят о высоком плодородии и достаточной обеспеченности почвогрунтов удобрениями.

Многие факторы, такие как условия и регион выращивания, сроки сбора плодов, возраст растений, влияют на количественное содержание эфирного масла в рамках одного сорта лимона, делая его показатель довольно изменчивым [29]. В нашем исследовании соблюдался принцип единственного различия, который состоял в выращивании лимонов сорта Ташкентский в закрытом грунте различных природно-климатических зон (г. Москва, г. Уфа). Почвогрунты теплиц характеризовались незначительной варибельностью по содержанию легкогидролизуемого азота, подвижных форм фосфора и калия. Данные различия были несущественны и, следовательно, не оказывали влияния на состав эфирных масел, что подтверждают исследования Пустового [19], согласно которым незначительные различия агрохимических свойств почвы при применении удобрений не приводят к существенному повышению продуктивности деревьев лимона разных сортов (Павловский, Мейер, Ташкентский, Юбилейный).

В наших исследованиях (табл. 3) мы отмечали высокую концентрацию D-лимонена, что также было установлено другими авторами [18] в эфирном масле кожуры лимона сорта Мейер, выращиваемого в субтропических условиях открытого грунта (г. Адана, Турция). Общее содержание монотерпеновых углеводородов в нашем случае незначительно превышает данные из предыдущей работы, однако мы замечаем низкую концентрацию сесквитерпеновых углеводородов, спиртов, эфиров и альдегидов, по сравнению с ранним исследованием [18]. Вероятно, это связано с сортовыми особенностями и условиями выращивания.

Масло исследуемого сорта лимона Ташкентский, выращиваемого в закрытом грунте различных природно-климатических зон, характеризуется высокой концентрацией D-лимонена, при этом содержание остальных мажорных и минорных компонентов варьировало. Высокое суммарное содержание эфирного масла кожуры плодов наблюдается при произрастании цитрусовых в культивационном сооружении, расположенном в г. Уфа. Месторасположение теплицы отличается высокой величиной ФАР (при ясном небе), что влияет на урожайность цитрусовых. Следовательно, можно заключить, что на качественный и количественный состав эфирного масла кожуры плодов лимона сорта Ташкент-

ский при выращивании внутри круглогодичных двускатных теплиц с естественным освещением и близкоширотным направлением влияет интенсивность светового потока.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xi W., Lu J., Qun J., Jiao B. Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars // J. Food Sci. Technol. 2017. V. 54. P. 1108. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2544-5>
2. Del Rio J.A., Fuster M.D., Gomez P., Porras I., Garcia-Lidon A., Ortuno A. *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest // Food Chem. 2004. V. 84. P. 457. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00272-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00272-3)
3. Ammad F., Moumen O., Gasem A., Othmane S., Hisashi K.N., Zebib B., Merah O. The potency of lemon (*Citrus limon* L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood // C. R. – Biol. 2018. V. 341. P. 97. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.01.003>
4. Wu P., Tang X., Jian R., Li J., Lin M., Dai H., Wang K., Sheng Z., Chen B., Xu X., Li C., Lin Z., Zhang Q., Zheng X., Zhang K. et al. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of essential oils of discarded perfume lemon and leaves (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) as possible sources of functional botanical agents // Front. Chem. 2021. V. 9. P. 679116. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.679116>
5. Bhuvanewari G., Thirugnanasampandan R., Gogulramnath M. Effect of colchicine induced tetraploidy on morphology, cytology, essential oil composition, gene expression and antioxidant activity of *Citrus limon* (L.) Osbeck // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2020. V. 26. P. 271. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00718-9>
6. Yeddes W., Mejri I., Grati Affes T., Khammassi S., Hamtami M., Aidi-Wannes W., Saidani Tounsi M. Combined effect of essential oils from Clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry), Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Lemon peel (*Citrus limon* (L.) Osbeck) on anti-bacterial, cytotoxic and anti-inflammatory activities // Trends Phytochem. Res. 2022. V. 6. P. 11. <https://doi.org/10.30495/tpr.2022.1949608.1239>
7. Campelo L.M.L., Gonçalves e Sá C., de Almeida A.A., Pereira da Costa J., Costa Marques T.H., Mendes Feitosa C., Barros Saldanha G., Mendes de Freitas R. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice // Pharmazie. 2011. V. 66. P. 623. <https://doi.org/10.1691/ph.2011.1508>
8. Yousefian Rad E., Homayouni Tabrizi M., Ardalan P., Seyedi S.M.R., Yadamani S., Zamani-Esmati P., Haghani Sereshkeh N. Citrus lemon essential oil nanoemulsion (CLEO-NE), a safe cell-dependent apoptosis inducer in human A549 lung cancer cells with anti-angiogenic activity // J. Microencapsul. 2020. V. 37. P. 394. <https://doi.org/10.1080/02652048.2020.1767223>
9. Matera R., Lucchi E., Valgimigli L. Plant essential oils as healthy functional ingredients of nutraceuticals and diet supplements: a review // Molecules. 2023. V. 8. P. 901. <https://doi.org/10.3390/molecules28020901>
10. Benoudjit, F., Maameri L., Ouared K. Evaluation of the quality and composition of lemon (*Citrus limon*) peel essential oil from an Algerian fruit juice industry // Algerian Journal of Environmental Science and Technology. 2020. V. 6. P. 1575.
11. Gironi F. Maschiotti M. Phase equilibrium of the system supercritical carbon dioxide – lemon essential oil: new experimental data and thermodynamic modelling // J. Supercrit. Fluids. 2012. V. 70. P. 8. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.06.003>
12. Li G., Tang L., Zhang X., Dong J., Xiao M. Factors affecting greenhouse microclimate and its regulating techniques: a review // IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 2018. V. 167. P. 012019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/167/1/012019>
13. Sethi V.P. On the selection of shape and orientation of a greenhouse: thermal modeling and experimental validation // Solar Energy. 2009. V. 83. P. 21. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2008.05.018>
14. Садыкова Ф.В. Опыт выращивания лимонов в Башкортостане. Уфа: ДизайнПолиграфСервис, 2009. 64 с.
15. Садыкова Ф.В. Опыт выращивания цитрусовых культур в условиях Уфимского лимонария // Садоводство и виноградарство. 2012. № 4. С. 31.
16. Середина В.П. Методы определения питательных элементов (НРК). Томск: ТГУ, 2007. С. 12.
17. Карпачева А.Н., Шеглова А.С. Биохимические методы анализа эфирномасличных растений и эфирных масел / Под ред. А.Н. Карпачева, К.Г. Персидская, Л.Н. Лиштванова // Симферополь: ВНИИЭМК, 1972. 107 с.
18. Дмитриева В.Л., Дмитриев Л.Б., Цицилин А.Н. Сравнительный анализ компонентного состава эфирных масел некоторых таксонов рода *Citrus* // От биохимии растений к биохимии человека / Под ред. А.И. Морозова, П.Г. Мизиной. М.: ВИЛАР. 2022. С. 156.
19. Система удобрений: методические указания для лабораторно-практических занятий, самостоятельных и контрольных работ / Сост.: А.Н. Мармулев, А.Г. Митракова. Новосибирск: НГАУ, 2015. 29 с.
20. Пустовой Н.Н. Технология выращивания лимона и оценка некоторых субтропических и тропических культур в защищенном грунте в условиях

- Саратовского Поволжья. Дис. ... канд. с-х. наук. Мичуринск, 2002. 109 с.
21. *Рыдин А.В., Горшков В.М.* Агроклиматические условия формирования урожая цитрусовых в зоне влажных субтропиков // Садоводство и виноградарство. 2012. № 6. С. 31.
 22. *Притула Э.В., Малокова Л.С., Козлова Н.В.* Особенности влияния комплекса экологических факторов на биохимические показатели качества чая сорта Колхида в условиях субтропиков России // Субтропическое и южное садоводство России. 2009. № 42-2. С. 86.
 23. *Билалова Э.Г., Садыкова Ф.В., Ишмуратова М.М.* Фенологические характеристики лимонов узбекской и башкирской селекции в условиях г. Уфы // Вестник ПГУ. Биология. 2018. № 3. С. 238.
 24. *Dinesh M.R., Reddy V.M.C.* Physiological basis of growth and fruit yield characteristics of tropical and sub-tropical fruits to temperature // Tropical Fruit Tree Species and Climate Change. 2012. V. 45. P. 45.
 25. *Байшоланов С.С., Павлова В.Н., Жакиева А.Р., Чернов Д.А., Габбасова М.С.* Агроклиматические ресурсы Северного Казахстана // Гидрометеорологические исследования и прогнозы. 2018. № 1. С. 168.
 26. *Садыкова Ф.В., Билалова Э.Г.* Агрохимическая характеристика почвогрунтов Уфимского лимонария // Биология растений и садоводство: теория, инновации. 2019. № 150. С. 123.
 27. *Srivastava A., Kohli R.* Soil suitability criteria for citrus: an appraisal // Agric. Rev. 1997. V. 18. P. 139.
 28. *Шафран С.А., Леонова Е.В., Пупынин В.М.* Внутрипольная вариабельность элементов питания в почвах и ее влияние на урожайность озимых зерновых культур // Агрехимия. 2011. № 2. С. 15.
 29. *Плугатарь Ю.В., Шевчук О.М., Феськов С.А., Федотова И.А., Тарба Ф.Т., Лейба В.Д.* Компонентный состав эфирного масла в листьях *Citrus limon* (L.) Osbeck при выращивании в разных условиях // Субтропическое и декоративное садоводство. 2019. № 70. С. 167.

УДК 581.1:633.81

ДЛИТЕЛЬНОЕ ПАССИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК *Melissa officinalis* L.

© 2024 г. Н. А. Егорова^{а, *}, О. В. Якимова^а, И. В. Белова^а^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки “Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма”, Симферополь, Россия

*e-mail: yegorova.na@mail.ru

Поступила в редакцию 19.01.2024

После доработки 22.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Изучены морфологические, цитофизиологические и биохимические (образование фенольных соединений) характеристики популяции каллусных культур клеток Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.) – ценного лекарственного и эфиромасличного растения. Каллусные культуры получены из эксплантов гипокотилей и семядолей проростков *in vitro* и выращивались более полутора лет (19 пассажей культивирования). Установлено, что в течение первых семи пассажей прирост массы каллуса существенно не различался, однако при дальнейшем субкультивировании интенсивность роста культур (масса каллуса к концу цикла выращивания) повышалась. Максимальный прирост каллуса отмечен в 17–19 пассажах – ростовые индексы каллусов, иницированных из семядолей и гипокотилей, достигли 13.7 и 11.5 соответственно, что в 3.0–3.4 раза выше, чем в первых циклах выращивания культур. Полученные данные свидетельствуют о возможности длительного субкультивирования каллусных культур клеток Melissa, в процессе которого происходит автоселекция клеток по признаку интенсивности роста. Впервые для культур клеток *M. officinalis* определена динамика прироста каллуса, плотности и жизнеспособности клеточной популяции, а также соотношения различных типов клеток в цикле выращивания культуры. Установлена продолжительность основных фаз роста клеточной популяции: лаг-фаза – с 1 по 6 сут.; фаза ускорения роста – с 6 по 10 сут. Экспоненциальная фаза роста проходила с 10 по 14 сут. и характеризовалась высокой удельной скоростью роста $\mu = 0.21 \text{ сут.}^{-1}$ с 14 по 20 сут. зафиксирована фаза замедления роста культуры ($\mu = 0.05 \text{ сут.}^{-1}$), которая сменилась фазой линейного роста (20–30 сут., $\mu = 0.08 \text{ сут.}^{-1}$) и стационарной фазой (30–40 сут. ростового цикла). Таким образом, установлен “ступенчатый” характер роста культур, что может быть обусловлено наличием в культуре субпопуляций клеток с разной интенсивностью роста. При первичном скрининге в каллусах листового происхождения выявлены флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты в количествах, сопоставимых с листьями интактных растений, что свидетельствует о сохранении у клеток *in vitro* способности образования вторичных метаболитов и перспективности проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Ключевые слова: *Melissa officinalis*, *in vitro*, каллусная культура, пассаж, фенольные соединения, цитофизиологические параметры, цикл роста

DOI: 10.31857/S0015330324040068, EDN: MNXDTW

ВВЕДЕНИЕ

Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.) – широко известное многолетнее эфиромасличное, лекарственное и пряно-ароматическое растение семейства *Lamiaceae*, которое произрастает в странах Средиземноморья, Центральной и Южной Европы, Северной Америки, Западной Азии, а также во многих регионах России [1, 2]. Из его сырья получают одно из самых дорогих эфирных масел (содержащих цитронеллаль, цитронеллол, нераль, гераниаль, линалоол и др.), а также CO₂-экстракт, в состав которого входят терпеноиды, жирные кисло-

ты, витамин Е, фитостерины и другие вещества [3, с. 69–70]. В надземных органах *M. officinalis* содержатся многие фенольные соединения, в том числе розмариновая кислота, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества и кумарины. Продукты переработки мелиссы обладают антиоксидантными, противовирусными, спазмолитическими, иммуномодулирующими и антимикробными свойствами и широко используются в медицине для лечения неврозов, ишемической болезни сердца, дерматитов, гастритов, атеросклероза, гипертонической и других болезней [4, 5].

Биотехнологические исследования этого ценного вида растения достаточно разнообразны и чаще всего направлены на разработку методик клонального микроразмножения *in vitro* [6–8]. Изучению процессов каллусогенеза посвящено очень мало работ, в основном они касаются оптимизации питательных сред и эксплантов для индукции каллуса или непрямого морфогенеза [9–11]. Значительное внимание исследователей привлекает анализ некоторых вторичных метаболитов, обычно извлекаемых из побегов, полученных при микроразмножении *in vitro*. В частности, имеются данные о накоплении в культивируемых микропобегах *M. officinalis* компонентов эфирного масла [12], флавоноидов и розмариновой кислоты [13, 14]. Есть сведения о синтезе некоторых фенольных соединений в зависимости от происхождения каллусов Melissa [15, 16].

Одним из основных этапов при разработке многих клеточных технологий растений (как получения исходного селекционного материала на основе соматональной изменчивости, так и биосинтеза вторичных метаболитов в каллусных или суспензионных культурах) является оптимизация условий для индукции и длительного пассирования каллусов с хорошей пролиферацией [17–19]. В ходе культивирования каллуса происходит адаптация клеток к условиям *in vitro*, формирование новых биологических систем и клеточных популяций, клетки которых начинают выполнять функции целых организмов, повышается генетическая гетерогенность каллусных клеток, а также ряд других процессов [20, 21]. Это обуславливает целесообразность изучения закономерностей роста и цитофизиологических изменений, происходящих в каллусных культурах за цикл выращивания. Подобные исследования позволяют не только расширить представления о закономерностях каллусогенеза, но и уточнить методические вопросы культивирования каллуса (например, определить оптимальную длительность цикла выращивания или сроки проведения обработок при клеточной селекции).

Цель работы – изучение ростовых и биосинтетических особенностей длительно пассируемых каллусных культур *M. officinalis* и определение некоторых цитофизиологических характеристик популяции каллусных клеток в цикле выращивания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали интактные растения Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.) сорта Цитронелла, выращенные в условиях закрытого грунта, а также каллусы, индуцированные из листьев растений (выращенных

в условиях закрытого грунта) или органов стеблевых проростков, полученных из семян в условиях *in vitro*.

Для введения в асептическую культуру в качестве эксплантов использовали высечки листовых пластинок (5 × 5 мм) донорных растений, а также сегменты гипокотилей и семядолей (4 × 5 мм) проростков *in vitro*. Исходный растительный материал (листья, семена) предварительно промывали в мыльном растворе 20 мин, ополаскивали в проточной воде 5–7 мин, а затем стерилизовали в течение 1 мин в 70% этаноле и 6 мин в 50% растворе препарата Бродофен 10Н (Florin, Венгрия) и трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Все работы по введению в культуру и пассированию каллусов выполняли в условиях ламинарного бокса БАВ-нп-01-“Ламинар-С”-1,2 (Lamsystems, Россия).

При введении в культуру *in vitro* и пассировании каллусов использовали ранее оптимизированную для Melissa [22] модификацию питательной МС-среды, содержащую 1.0 мг/л 2,4-Дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) (Sigma-Aldrich, США). Экспланты и каллусные ткани культивировали в закрытых ватно-марлевыми пробками пробирках (150 × 16 мм), содержащих 10 мл питательной среды. Культивирование осуществляли при температуре 26° ± 2°С, относительной влажности воздуха 70%, освещении 2–3 клк и продолжительности фотопериода 16 ч.

Пересадку каллусов на свежую питательную среду проводили в асептических условиях, при этом масса каллусного транспланта составляла 80–90 мг. Продолжительность цикла выращивания каллусных культур была 30–35 сут. В процессе культивирования проводили визуальный анализ развития каллусов. В конце цикла выращивания оценивали интенсивность роста каллуса весовым методом – определяли массу сырого каллуса путем его взвешивания. Индекс роста каллуса (I) определяли по формуле [23]:

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

где X_0 и X_{\max} – масса каллуса в начале цикла выращивания (масса транспланта) и максимальное ее значение в конце цикла (30–35 сут.) соответственно.

Для исследования цитофизиологических характеристик использовали каллусы девятого пассажа, полученные из эксплантов гипокотилей. Анализ цитофизиологических параметров популяции каллусных клеток в цикле выращивания проводили на 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45 сут. культивирования. Массу сырого каллуса оценивали на основании взвешивания не менее 20 индивидуальных каллусов. Удельную скорость роста (μ) определяли по формуле [23]:

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

где X_2 и X_1 — значение критерия роста (сырая масса клеток) в момент времени t_2 и t_1 соответственно.

Плотность каллуса (количество клеток на 1 мг сырой массы) определяли в 6-кратной повторности путем подсчета клеток в камере Фукса — Розенталя (Мини-Мед, Россия) после мацерации 100 мг каллуса в 20% хромовой кислоте при 60°C в термостате ТВЗ-25 (Медлабор-техника, Украина). Жизнеспособность клеток оценивали после окраски 0.5% метиленовым синим [23]. Цитологические препараты анализировали под микроскопом БИОЛАМ И (ЛОМО, Россия). В каждом варианте анализировали 500 клеток в 3-кратной повторности. При цитологическом анализе соотношения разных типов клеток на препаратах после окраски ацетокармином, приготовленном при использовании кармина (Merck, Германия), подсчитывали по 100 клеток в 10-кратной повторности. Выделяли несколько морфологических типов клеток: меристемо- и паренхимоподобные клетки, среди которых выделили три типа — округлые, гигантские и удлиненные.

Определение общих фенольных соединений, дубильных веществ и суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот проводили титриметрическим методом (модификация двух методов: метода Левенталя [24] и способа определения полифенолов по фракциям [25]). Для анализа использовали листья интактных растений и каллус листового происхождения первого пассажа, высушенные до 9–12% влажности. Навеску растительного материала (2 г) экстрагировали горячей дистиллированной водой на водяной бане 5drops-2S (Tianjin City Taisite Instrument CO. LTD, Китай) в течение 30 мин. Экстракт охлаждали, отфильтровывали и отбирали для анализа 10 мл (аликвота), добавляли 750 мл дистиллированной воды и 25 мл раствора индигокармина (РМ Инжиниринг, Россия). Полученную смесь титровали 0.1 N раствором перманганата калия до окрашивания в золотисто-желтый цвет. В контроле аликвотную часть раствора заменяли дистиллированной водой. Содержание полифенольных соединений определяли согласно рекомендациям [25].

Дубильные вещества дополнительно осаждали с помощью 5% раствора желатина, охлаждали 2 сут. при температуре 3–4°C в холодильнике ХЛ-340 (POZIS, Россия). Полученный раствор центрифугировали на центрифуге (TAGLER CM-12, Россия) при 3000 об./мин. в течение 5 мин. Затем отбирали фильтрат, в котором определяли суммарное содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот титрованием перманганатом калия. Количество дубильных веществ рассчитывали по разнице между содер-

жанием полифенолов и суммарным содержанием флавоноидов и фенолкарбоновых кислот.

Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам, с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010). На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке многих клеточных технологий одним из необходимых этапов является оптимизация условий для длительного пассирования каллусных культур и анализ морфо-физиологических параметров их роста. Ранее в наших исследованиях была подобрана питательная среда для индукции и пассирования каллусов из разных типов эксплантов мелиссы — сегментов органов интактных растений, а также асептических проростков, полученных из семян в условиях *in vitro* [22]. При культивировании на этой среде сегментов гипокотилей и семядольных листьев были получены каллусы, которые имели светло-бежевую окраску и плотную консистенцию с небольшими рыхлыми участками (рис. 1а, б), а из эксплантов листа растений — каллусы бежево-зеленой окраски и более плотной консистенции (рис. 1в).

Для каллусных культур мелиссы, полученных из гипокотилей и семядолей, проведен анализ пролиферации каллусов при длительном субкультивировании на протяжении 19 пассажей (рис. 2). В процессе выращивания культур отмечено, что каллусы из разных типов эксплантов в процессе длительного пассирования становились более рыхлыми. Установлено, что в течение первых семи пассажей прирост каллуса существенно не различался. Ростовой индекс при этом не превышал 4.3–4.6, а масса каллуса — 500–550 мг. Начиная с 9-го пассажа, выявлено достоверное увеличение массы каллуса из гипокотилей по сравнению с каллусом, полученным из семядолей. Следует отметить, что в каждом последующем пассаже масса каллусов (в конце цикла выращивания), полученных из разных типов эксплантов, повышалась, а максимальный прирост массы каллусной ткани отмечен в 17–19 пассажах. Ростовой индекс каллусных культур из семядолей и гипокотилей в этот период достигли 13.7 и 11.5 соответственно, что почти в 3.0–3.4 раза выше, чем в 1–7 пассажах. Такое повышение ростовой активности каллусных культур мелиссы, по-видимому, является следствием автоселекции хорошо растущих каллусных линий в пересадочной культуре и оптимальным сочетанием факторов культивирования, способствующим их успешной адаптации

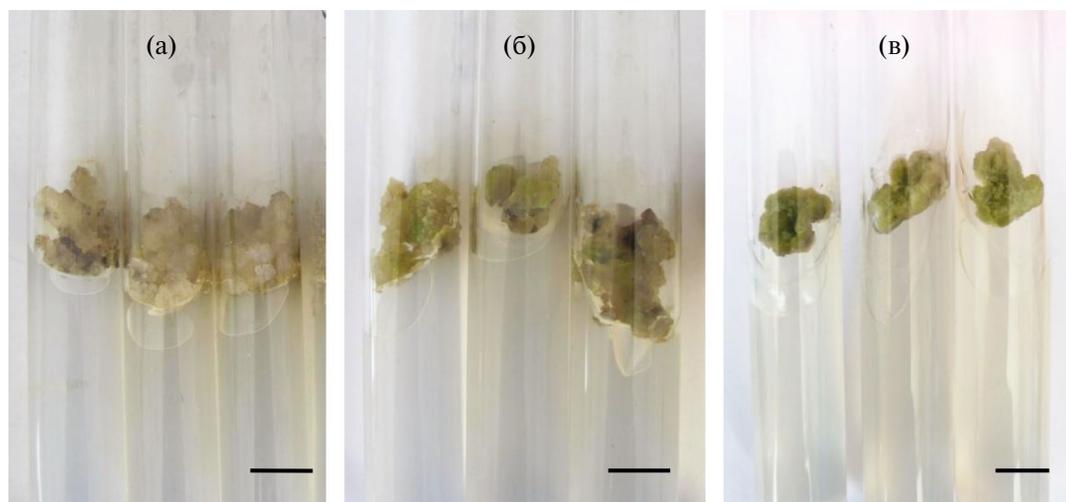


Рис. 1. Каллусные культуры *M. officinalis*, полученные из эксплантов: а – гипокотили (9 пассаж); б – семядоли (9 пассаж); в – листа (1 пассаж). Масштаб: 10 мм.

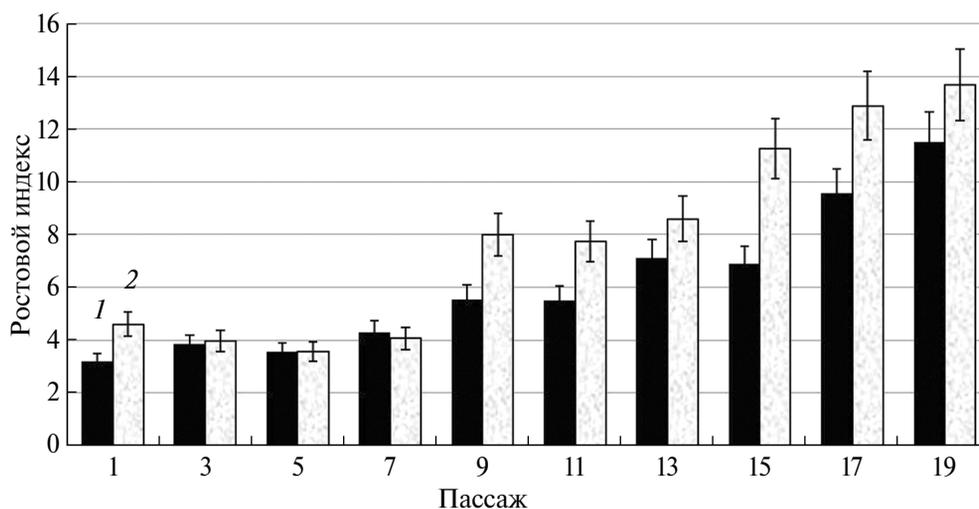


Рис. 2. Влияние пассажа и типа экспланта на прирост каллуса *M. officinalis* при его длительном культивировании. 1 – эксплант семядоли; 2 – эксплант гипокотили.

к используемым условиям выращивания *in vitro*. Это свидетельствует о возможности длительного (как минимум, в течение двух лет) пассирования каллусов мелиссы, а также отбора клеток по интенсивности роста, который происходит “скачкообразно” – после 7-го цикла выращивания. Из данных литературы для некоторых видов растений отмечалось, что основные изменения в пассируемых каллусных культурах происходят до 8–12 пассажей [20, с. 259–266]. В частности, улучшение роста каллусных культур при их длительном субкультивировании было выявлено у *Alhagi persarum* [26]. В.А. Кунах [20, с. 262–266] при анализе изменчивости прироста массы каллусов разных штаммов более десятка видов растений выделил пять основных типов роста.

При этом у штаммов 1 типа не наблюдалось существенных изменений роста в течение 24–40 пассажей, тогда как у 2–4 типов изменчивости прироста биомассы в процессе формирования клеточных штаммов происходило снижение биомассы после 1–2 пассажей, а затем повышение этого параметра с различной динамикой в ходе пассажей. Судя по полученным нами экспериментальным результатам, каллусные культуры мелиссы отличались от описанных типов, так как в течение 1–7 пассажей у каллусов из гипокотили изменений не наблюдали, а у каллусных культур, полученных из семядолей, происходило незначительное повышение ростового индекса. Дальнейшее существенное повышение прироста биомассы в течение изученных 19 пас-

сажей свидетельствует о продолжении процесса формирования штаммов с высокой пролиферативной активностью.

Для исследования динамики цитофизиологических параметров в цикле выращивания каллусной культуры мелиссы использовали каллус 9 пассажа, полученный из эксплантов гипокотилей, поскольку, начиная с этого пассажа, был отмечен более активный рост каллусных культур клеток мелиссы. Проведенный цитологический анализ каллусной культуры позволил выделить несколько морфологических типов клеток – меристемоподобные (мелкие, округлые, с крупным занимающим значительную часть клетки ядром, хорошо окрашиваемой цитоплазмой и соотношением “ширина : длина” менее 1 : 2) (рис. 3а) и паренхимоподобные, среди которых выделили три типа – округлые (небольшого размера и соотношением длины и ширины 1 : 1 или 1 : 2) (рис. 3б), гигантские (овальной или грушевидной формы, превышающие в 2–5 раз округлые) (рис. 3г) и удлинённые (у которых длина в несколько раз превышала ширину) (рис. 3в). Паренхимоподобные клетки отличались от меристемоподобных, прежде всего, более мелким ядром по сравнению с размером клетки, которое часто (особенно у гигантских и удлинённых клеток) располагалось у клеточной стенки. У клеток паренхимоподобного типа отмечали одну большую или несколько мелких вакуолей, что особенно характерно для гигантских клеток. Выделение таких типов клеток обусловлено разнообразием анализируемой популяции каллусных клеток мелиссы и возможностью более детального анализа происходящих в ходе культивирования процессов.

Данные об изменении массы и плотности каллуса, жизнеспособности клеточной популяции и соотношения разных типов клеток на протяжении 45 сут. культивирования представлены на рис. 4–7. Кривые роста массы каллуса представлены в обычной (рис. 4) и полулогарифмической системе координат (рис. 5), что позволяет более точно определить динамику изменения

ростовых характеристик и выделить фазы роста в цикле выращивания.

Установлено, что изменение массы каллуса в течение цикла выращивания в целом характеризовалось достаточно типичной S-образной кривой (рис. 4, 5). При этом отмечали более чем 8-кратное увеличение этого параметра за месяц культивирования. Такое накопление биомассы каллуса у мелиссы не очень значительно, хотя, как указывалось выше, при более длительном субкультивировании ростовой индекс каллуса повышался. Для некоторых эфиромасличных и лекарственных видов растений также сообщалось об относительно слабом приросте каллусных культур в течение пассажа, в частности, у каллусных культур *Foeniculum vulgare* ростовой индекс достигал всего 3.8 [27, с. 222–225], а у *Sutherlandia frutescens* – 5.9 [28]. Однако у некоторых видов выявлен более интенсивный рост каллуса – так, за цикл выращивания масса каллусной ткани у розы эфиромасличной увеличилась в 17 раз, у лаванды – в 18 раз, а у аниса – более чем в 40 раз [27, с. 71–243].

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что в исследуемом цикле выращивания в течение первых шести суток культивирования масса каллуса достоверно не увеличилась, отсутствовал видимый рост клеток, что соответствует лаг-фазе ростового цикла. В первые 2–3 сут. этого периода жизнеспособность клеточной популяции снизилась до 37.5% (рис. 4), что, вероятно, связано со стрессовым и/или травматическим действием пересадки и адаптацией популяции каллусных клеток. Следует отметить, что в течение первых шести суток плотность каллуса была минимальной – около 2000 клеток/мг, что почти в 2 раза меньше, чем при последующем культивировании (рис. 6), что обусловлено максимальным числом более крупных паренхимоподобных клеток и, следовательно, их меньшим числом на мг каллуса (рис. 7).

На 8 сут. культивирования отмечено достоверное увеличение массы каллуса – до 110 мг. Период с 8 по 10 сут., по-видимому, можно

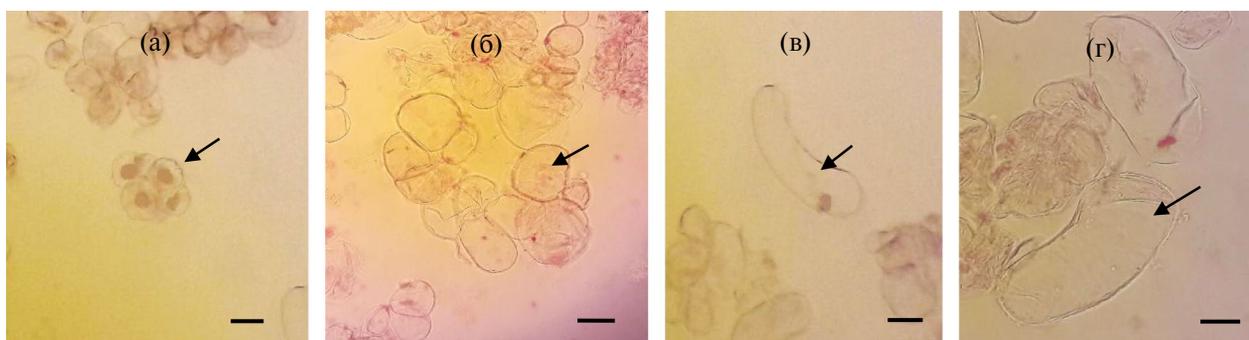


Рис. 3. Типы клеток в каллусной культуре *M. officinalis* – меристемоподобные (а) и паренхимоподобные клетки: округлые (б), удлинённые (в), гигантские (г). Масштаб: 50 мкм.

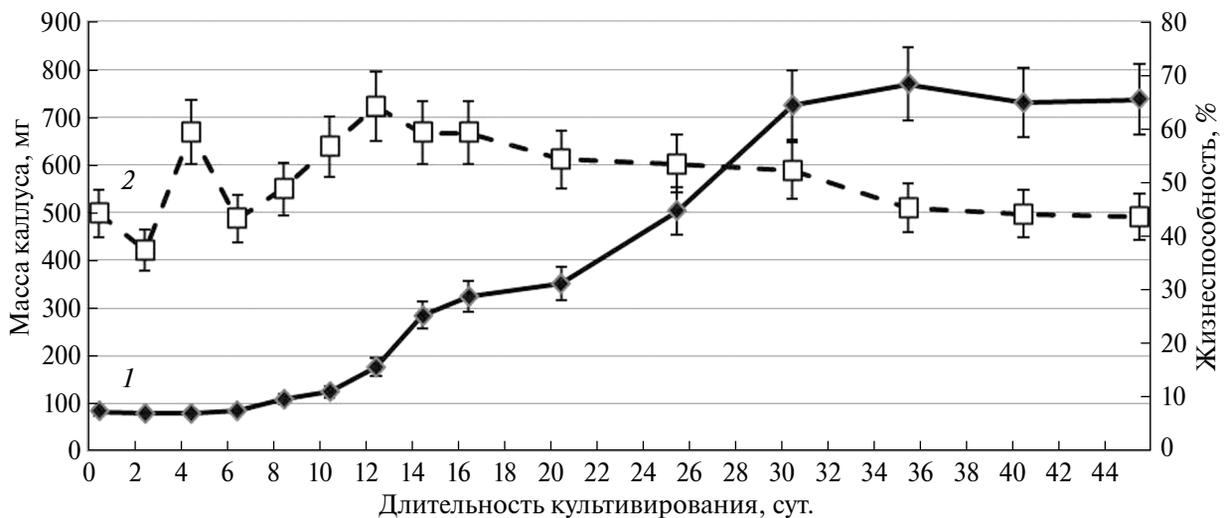


Рис. 4. Динамика изменения массы каллуса и жизнеспособности клеточной популяции в цикле выращивания каллусной культуры *M. officinalis*. 1 – масса каллуса; 2 – жизнеспособность.

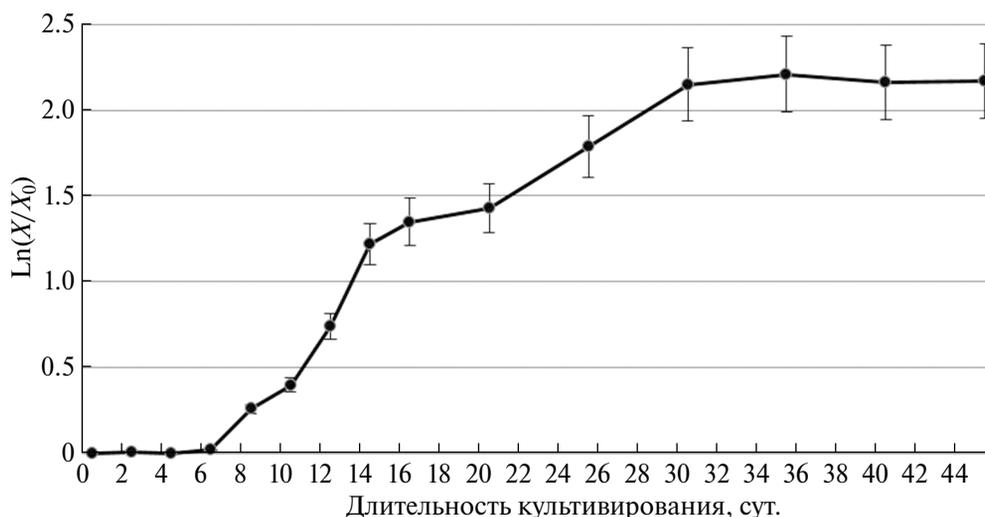


Рис. 5. Динамика изменения массы каллуса в цикле выращивания каллусной культуры *M. officinalis* в полулогарифмической системе координат.

выделить как фазу ускорения роста, когда наблюдался незначительный прирост каллуса (до 125 мг). Начиная с 10 сут., популяция каллусных клеток вступила в экспоненциальную (логарифмическую) фазу роста, которая продолжалась до 14 сут. В этот период жизнеспособность клеточной популяции возрастала, и к 12 сут. культивирования достигла максимального значения 64.2% (рис. 4). При этом происходило интенсивное деление клеток, о чем свидетельствует повышение количества меристемоподобных клеток и плотности каллуса за счет увеличения числа клеток на единицу массы. На 12–16 сут. культивирования выявлено максимальное содержание клеток меристематического типа (до 54.1%) в каллусной ткани (рис. 7). В экспоненциальной фазе также отмечена максимальная плотность

клеточной популяции, которая составила более 5000 клеток/мг (рис. 6).

Необходимо отметить “ступенчатый” характер роста каллусной культуры мелиссы – активный экспоненциальный рост с 10 по 14 сут. (линейный участок графика в полулогарифмической системе координат: удельная скорость роста $\mu = 0.21 \text{ сут.}^{-1}$), затем наблюдали замедление роста с 14 по 20 сут. ($\mu = 0.05 \text{ сут.}^{-1}$) и последующую активацию роста с 20 по 30 сут. ($\mu = 0.08 \text{ сут.}^{-1}$). Исходя из данных литературы, такой “ступенчатый” характер роста культуры может быть обусловлен наличием в них субпопуляций клеток с разной интенсивностью роста. Можно предположить наличие как минимум двух клеточных субпопуляций (линий) с разной скоростью пролиферации, что привело к фор-

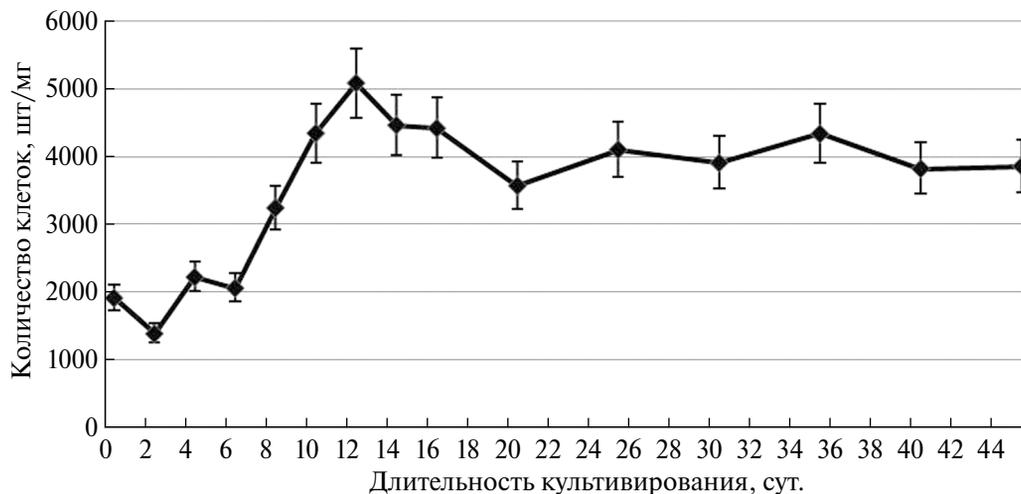


Рис. 6. Динамика изменения плотности каллуса в цикле выращивания каллусной культуры *M. officinalis*.

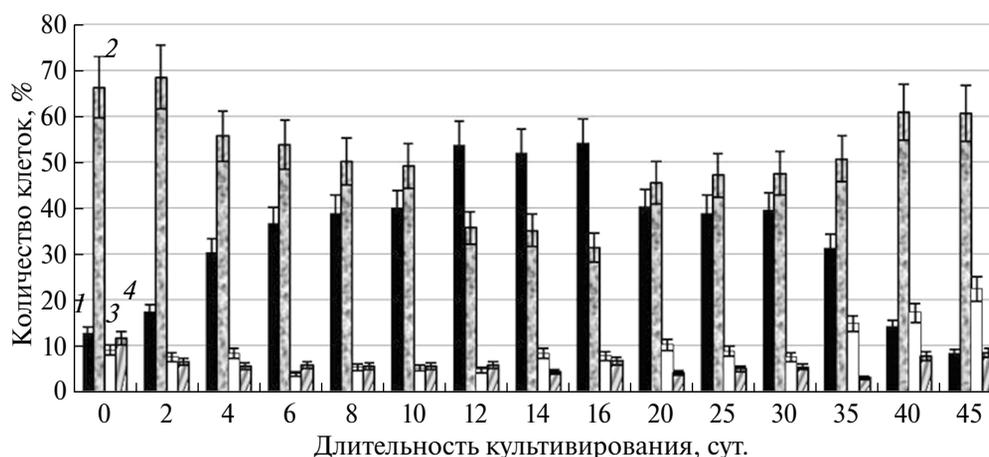


Рис. 7. Динамика изменения соотношения различных типов клеток в цикле выращивания каллусной культуры *M. officinalis*. 1 – меристемоподобные; 2 – округлые паренхимоподобные; 3 – гигантские паренхимоподобные; 4 – удлиненные паренхимоподобные.

мированию сложной кривой динамики роста, поскольку экспоненциальная фаза одной популяции может накладываться на линейную другой. Отбор в популяциях изолированных клеток в условиях *in vitro* основан на их высокой генетической вариабельности и различных темпах роста, приводящих по мере культивирования к разному соотношению вариантов с различной пролиферативной активностью [20, с. 231–338]. В качестве примера можно привести анализ прироста сухой биомассы в цикле выращивания миксоплоидного каллусного штамма АЕ-3 *Arnebia euchroma*, у которой также отмечали два выхода на плато на кривой роста (5–9 и 14–16 сут.) [20, с. 493–495].

Период с 20 по 30 сут. культивирования соответствовал линейной фазе роста клеточной популяции, когда скорость роста постоянна. В этот период масса каллуса увеличивалась более чем в 2 раза (с 350 до 720 мг). Прирост массы кал-

луса происходил, по-видимому, в основном за счет растяжения клеток, о чем свидетельствует снижение плотности клеточной популяции (до 3600–4100 кл./мг). К концу данной фазы количество меристемоподобных клеток уменьшилось в 1.4 раза (39.5%) и, соответственно, увеличилось до 47.6% число более крупных паренхимоподобных округлых клеток (рис. 7).

На 30–35 сут. культивирования происходил переход клеточной популяции в стационарную фазу роста. Судя по представленным данным, прекращался достоверный прирост массы каллуса, жизнеспособность клеточной популяции снизилась до 43.7% (рис. 4). К 45 сут. культивирования число клеток меристематического типа снизилось до 8.4% и возросло количество паренхимоподобных клеток (округлых – до 60.7%; гигантских – до 22.4%, удлиненных – до 8.5%). Аналогичные закономерности в конце цикла выращивания каллуса отмечали и у других видов

растений — *Lavandula angustifolia*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare*, *Anisum vulgare.*, *Rosa* spp. [27, с. 71–243], *Artemisia dracuncululus* [29].

Таким образом, на основе сопоставления изученных цитофизиологических параметров каллусной ткани Melissa определена продолжительность основных фаз развития клеточной популяции: лаг-фаза — с 1 по 6 сут.; 8–10 сут. — фаза ускорения роста; экспоненциальная фаза с 10 по 14 сут., замедление роста — “ступенька” (14–20 сут.), линейная — 20–30 сут. и стационарная фаза — 30–40 сут. ростового цикла.

Судя по имеющимся литературным данным, продолжительность фаз ростового цикла существенно варьирует у разных видов эфиромасличных и лекарственных растений. Так, у аниса обыкновенного и лаванды узколистной латентная фаза была в пределах 1–3 сут., тогда как у фенхеля обыкновенного она составила 12–14 сут. Стационарная фаза роста наступала у лаванды узколистной на 26–30 сут., у фенхеля обыкновенного — на 45–50 сут. культивирования [27, с. 71–243], у унгернии Виктора — на 50–60 сут., а у раувольфии змеиной только на 60–70 сут. [20, с. 412–606]. Отмечены отличия и в структуре клеточных популяций, в частности, минимальное количество гигантских клеток выявлено у розы эфиромасличной (до 10%), тогда как в каллусе герани эфиромасличной число таких клеток достигало 42% [27, с. 164–193]. У Melissa, как показали наши исследования, число гигантских паренхимоподобных клеток не превышало 18–22% в конце цикла выращивания.

Выявленные у Melissa лекарственной закономерности позволяют обосновать оптимальную длительность цикла выращивания, а также определить подходящую фазу роста для обработки каллусов различными соединениями или стрессорами при разработке методик мутагенеза *in vitro* или клеточной селекции на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам с целью получения резистентных соматклонов. Вместе с тем каллусные культуры могут использоваться не только в клеточных

технологиях, позволяющих индуцировать растения-регенеранты и на их основе создавать новые сорта, но и, возможно, в биотехнологии получения вторичных метаболитов *in vitro*. В доступных литературных источниках сведения о накоплении фенольных соединений в каллусных культурах Melissa очень немногочисленны, при этом авторы анализировали каллусы из сегментов стебля и не проводили сравнения с исходными растениями [15, 16]. Для определения целесообразности исследований такого рода мы провели первичный скрининг каллусных культур Melissa на наличие фенольных соединений (табл. 1). Для этого использовали каллусы, полученные из эксплантов листьев, поскольку известно, что синтез вторичных метаболитов *in vitro* обычно наблюдается в культурах, полученных из тех органов, в которых они накапливаются в интактных растениях [20, с. 410–616; 30]. В своих экспериментах мы отбирали культуры в стационарной фазе роста, которая у Melissa приходится на 30–40 сут. цикла выращивания. Выбор этого периода обусловлен имеющимися литературными данными о разобшенности во времени процессов роста в клеточной популяции и биосинтеза вторичных метаболитов, в связи с чем их максимальное содержание чаще обнаруживается в стационарной фазе [17, 20 с. 410–615; 31]. В результате проведенного анализа в каллусах Melissa были обнаружены фенольные соединения, причем их общее содержание (2.7%) было в 3.7 раза меньше, чем в листьях растений (9.8%). При этом дубильных веществ в культурах *in vitro* не выявлено, хотя в листьях показано их присутствие. Однако по сумме флавоноидов и фенолкарбоновых кислот образцы из листьев растений и каллусов достоверно не отличались (соответственно, 3.4 и 2.7%).

Полученные данные вполне согласуются с отмечаемыми многими исследователями фактами о том, что в клеточных культурах растений происходит синтез лишь некоторых, а иногда и не характерных для данного вида растения соединений, причем, как правило, в меньших ко-

Таблица 1. Содержание фенольных соединений в листьях и каллусных культурах *M. officinalis*

Растительный материал	Общее содержание фенольных соединений, %	Сумма флавоноидов и фенолкарбоновых кислот, %	Содержание дубильных веществ, %
Листья исходных растений	9.79 ± 0.31	3.43 ± 0.36	6.36 ± 0.06
Каллусы из эксплантов листа	2.67 ± 0.32	2.67 ± 0.32	0

личествах [17, 20, 30]. Единичные литературные сведения о накоплении фенольных соединений в каллусных или суспензионных культурах мелиссы лекарственной в основном посвящены анализу влияния состава питательной среды на их синтез. Так, Topdemir с соавт. [15] выявили в каллусе, индуцированном из узловых эксплантов *M. officinalis*, максимальное количество суммы фенольных соединений на питательной среде с 1.5 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л БАП. В другом исследовании в каллусной культуре из сегментов стебля проростков (полученных из семян *in vitro*) мелиссы было показано наличие простых фенолов и флавоноидов, содержание которых повышалось при введении в питательную среду 300 мМ нитрата кадмия [16]. В нашей работе у *M. officinalis* впервые в каллусных культурах, полученных из листовых эксплантов, выявлены фенольные соединения в количествах, близких к их содержанию в интактных растениях. Это свидетельствует о перспективности проведения дальнейших более детальных исследований по изучению биосинтеза вторичных соединений у этого ценного лекарственного и эфиромасличного растения

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных работ изучены длительно выращиваемые каллусные культуры мелиссы лекарственной и показано увеличение интенсивности роста каллусной культуры клеток после 9-го пассажа, которая постоянно повышалась в течение последующих 10 пассажей. Ростовые индексы каллусных культур, полученных из эксплантов семядолей и гипокотилей, достигали в этих пассажах 13.7 и 11.5 соответственно, что почти в 3.0–3.4 раза выше, чем в начальных 1–7-м пассажах. Впервые установлены особенности и продолжительность основных фаз роста популяции каллусных клеток в цикле выращивания. Показано, что цикл выращивания каллусной культуры мелиссы составляет 30–40 сут. Полученные нами данные свидетельствуют о возможности длительного (не менее двух лет) субкультивирования каллусных культур мелиссы. При первичном скрининге в каллусах *M. officinalis* листового происхождения выявлено накопление флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в количествах, сопоставимых с листьями интактных растений.

Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZW-2022-0008 (122101300035-2) при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prawal Pratap Singh Verma, Anand Singh, Laiq-ur-Rahaman, Bahl J.R. Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) an herbal medicinal plant with broad therapeutic uses and cultivation practices: a review // IJRAMR. 2015. V. 2. P. 0928.
2. Shakeri A., Sahebkar A., Javadi B. *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology // J. Ethnopharmacol. 2016. V. 188. P. 204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
3. Пауштецкий В.С., Тимашева Л.А., Пехова О.А., Данилова И.Л., Серебрякова О.А. Эфирные масла и их качество. Симферополь: ИТ “АРИАЛ”, 2021. 212 с. <https://doi.org/10.33952/2542-0720-978-5-907506-16-9>
4. Virchea L.I., Gligor F.G., Frum A., Mironescu M., Myachikova N.I., Georgescu C. Phytochemical analysis and antioxidant assay of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) // *BIO Web of Conferences*. 2021. V. 40. Art. 02004. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20214002004>
5. Alizadeh Behbahani B., Shahidi F. *Melissa officinalis* Essential oil: chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity // *Nutr. Food Sci. Res.* 2019. V. 6. P. 17. <https://doi.org/10.29252/nfsr.6.1.17>
6. Radomir A.M., Stan R. *In vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. // *Rom. J. Horticult.* 2020. V. 1. P. 15. <https://doi.org/10.51258/RJH.2020.02>
7. Petrova M., Nikolova M., Dimitrova M., Dimitrova L. Assessment of the effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation and metabolic profiles of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) // *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 2021. V. 11. e4077. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.4077>
8. Егорова Н.А., Якимова О.В. Влияние длительного субкультивирования на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. и *Origanum vulgare* L. // *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2019. Т. 47. С. 22. <https://doi.org/10.17223/19988591/47/2>
9. Ghiorghita G.I., Maftei D.E.St., Nicuta D.N. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species // *Anal. Stiintifice ale Universitatii “Alexandru Ioan Cuza”, Geneticasi Biologie Moleculara*. 2005. V. 5. P. 119.
10. Meftahizade H., Moradkhani H., Naseri B., Lofti M., Naseri A. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes // *J. Med. Plant Res.* 2010. V. 4. P. 240.
11. Aasim M., Kahveci B., Korkmaz E., Doganay F., Bakirci S., Sevinc C., Akin F., Kirtis A. TDZ-IBA induced adventitious shoot regeneration of water balm (*Melissa officinalis* L.) // *J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci.* 2018. V. 6. P. 35.
12. Mokhtarzadeh S., Demirci B., Goger G., Khawar K.M., Kirimer N. Characterization of volatile components in

- Melissa officinalis* L. under *in vitro* conditions // J. Es-sent. Oil Res. 2017. V. 29. P. 299.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1216900>
13. Mousavi S.-M., Shabani L. Rosmarinic acid accumulation in *Melissa officinalis* shoot cultures is mediated by ABA // Biol. Plantarum. 2019. V. 63. P. 418.
<https://doi.org/10.32615/bp.2019.057>
 14. Ebrahimi M., Kiarostami K., Nazem Bokae Z. Effect of salicylic acid on antioxidant properties of *in vitro* proliferated shoots of *Melissa officinalis* L. // Nova Biologica Reperta. 2019. V. 5. P. 420.
 15. Topdemir A., Gur N., Demir Z. Determination of total phenolic compounds and flavanoids in callus cultures of lemon grass (*Melissa officinalis* L.) stimulated with different plant growth regulators // Eur. J. Bio. Chem. Sci. 2018. V. 1. P. 7.
 16. Mousavi N., Razavizadeh R. Evaluation of changes in phenolic compounds and secondary metabolites of calluses and seedlings of *Melissa officinalis* L. under cadmium heavy metal stress // J. Plant Process Funct. 2021. V. 10. P. 17.
 17. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 609.
<https://doi.org/10.1134/S000368381107009X>
 18. Решетников В., Спиридович Е., Фоменко Т., Носов А. Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциала // Наука и инновации. 2014. Т. 5. С. 21.
 19. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures // Engineering. 2019. V. 5. P. 50.
<https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
 20. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 724 с.
 21. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an *in vitro* morphogenesis pathway in cereals // Russ. J. Dev. Biol. 2018. V. 49. P. 245.
<https://doi.org/10.1134/S106236041805003X>
 22. Якимова О.В., Егорова Н.А. Каллусогенез и морфогенез в культуре изолированных органов и тканей *Melissa officinalis* L. *in vitro* // Ученые записки Таврич. нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия “Биология, химия”. 2014. Т. 27. С. 191.
 23. 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. 386 с.
 24. Запретов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа, 1974. 214 с.
 25. Федосеева Г.М. Способ определения полифенольных соединений. Патент СССР, 1215708А. А 61 К 35/78. 1986.
 26. Титова М.В., Кочкин Д.В., Соболева Г.И., Фоменков А.А., Сидоров Р.А., Носов А.М. Получение и характеристика каллусных культур клеток *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse – продуцентов изофлавоноидов // Биотехнология. 2020. Т. 36. С. 35.
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-35-48>
 27. Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД “Автограф”, 2021. 315 с.
<https://doi.org/10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4>
 28. Nosov A.V., Titova M.V., Fomenkov A.A., Kochkin D.V., Galishev B.A., Sidorov R.A., Medentsova A.A., Kotenkova E.A., Popova E.V., Nosov A.V. Callus and suspension cell cultures of *Sutherlandia frutescens* and preliminary screening of their phytochemical composition and antimicrobial activity // Acta Physioli Plant. 2023. V. 45. Art. 42.
<https://doi.org/10.1007/s11738-023-03526-7>
 29. Инюткина А.Г., Егорова Н.А. Цитофизиологические особенности каллусной ткани полыни эстрагон // Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Серія Біологія. 2011. Т. 3. С. 67.
 30. Claudia A. Espinosa-Leal, Cüsar A. Puente-Garza, Silverio Garcia-Lara *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds // Planta. 2018. V. 248. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
 31. Berezina E.V., Brilkina A.A., Schurova A.V., Veselov A.P. Accumulation of biomass and phenolic compounds by calluses *Oxycoccus palustris* PERS. and *O. macrocarpus* (AIT.) PERS in the presence of different cytokinins // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 67.
<https://doi.org/10.1134/S1021443718050035>

УДК 581.1,577.115

КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ФРАКЦИЙ СТЕРИНОВ ТОНОПЛАСТА В УСЛОВИЯХ СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ИОНАМИ МЕДИ

© 2024 г. И. С. Капустина^а, Е. В. Спиридонова^а, Н. В. Озолина^а,
А. В. Третьякова^б, В. В. Гурина^{а,*}

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

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

*e-mail: nichka.g@bk.ru

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 26.03.2024 г.

Исследовано влияние токсических концентраций ионов меди (Cu^{2+}) (100 и 500 мкМ) на состав стеринов вакуолярной мембраны корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). В результате проведенных исследований выявлено 12 соединений во фракции свободных стеринов (СС) и 11 соединений во фракции эфиров стеринов (ЭС). В составе ЭС присутствовали соединения, не обнаруженные в составе СС. Интересно, что при 500 мкМ Cu^{2+} суммарное содержание этих биологически активных соединений увеличивалось. Наблюдалось снижение таких три-терпенов как ланоста-7,9(11)-диен-3 β ,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)-(C₃₄H₅₄O₅) в СС и ЭС. Во фракции СС происходило повышение содержания соединения 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- при стрессе, в то время как в ЭС его количество снижалось. Установлено, что суммарное содержание Δ^5 -стеринов, в норме и при стрессе, составляло не более 33% во фракции свободных стеринов и 21% во фракции эфиров стеринов. Преобладающим стеринном был β -ситостерин. Его содержание снижалось в условиях изучаемого стресса в обеих фракциях стеринов. Полученные результаты показывают, что фракции стеринов тонопласта (СС и ЭС) представлены не только Δ^5 -стеринами, которые в основном изучаются в работах посвященным мембранологии и липидологии растений, а также соединениями тритерпенового ряда и другими веществами, обладающими биологической активностью. Обнаруженные вещества, возможно, могут влиять на биофизические показатели тонопласта и на метаболические процессы клетки, в которых задействована вакуолярная мембрана. Выявленные соединения активно реагировали на токсическое воздействие ионов Cu^{2+} , что можно рассматривать как один из механизмов защиты растительной клетки от стресса.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, вторичные метаболиты, ионы меди, стерины, тонопласт, эфиры стеринов

DOI: 10.31857/S0015330324040075, EDN: MNSAQX

ВВЕДЕНИЕ

Действие тяжелых металлов (ТМ), по-разному отражается на физиологии растений. Растения способны экстрагировать из почвы и воды медь, мышьяк, кадмий, ртуть, селен, свинец и другие элементы. Токсическая доза металлов зависит от типа иона, его концентрации, вида растения и стадии его роста. Важно отметить, что диапазон концентраций Cu^{2+} , не оказывающих выраженного токсического воздействия, весьма узок для разных растений. Медь (Cu^{2+}) — является одним из

незаменимых микроэлементов для жизнедеятельности растений. Известно, что Cu^{2+} входит в состав пластоцианина, осуществляющего перенос электронов между фотосистемами I и II в процессе фотосинтеза. Значительна роль Cu^{2+} и в азотном обмене растений. Также Cu^{2+} участвует в регулировании водного баланса. Почти вся доля Cu^{2+} в низких концентрациях прочно связана с различными белками. При переизбытке накопления Cu^{2+} в почвах из эссенциального микроэлемента она становится токсичным поллютантом второго класса опасности — тяжелым металлом, обладающим высокой реакционной способностью по отношению к произрастающим на данной территории

Сокращения: СС — свободные стерины, ТМ — тяжелые металлы, ЭС — эфиры стеринов.

растениям. Избыточная аккумуляция Cu^{2+} в растениях приводит к нарушению многих метаболических реакций, что отражается на снижении биомассы и качестве сельскохозяйственной продукции, либо приводит к полной гибели растения [1–3]. В связи с этим большой интерес вызывают различные биологические методы очистки окружающей среды от ТМ. Эти методы считаются разумными и безопасными, так как основаны на естественных механизмах, встречающихся в природе. Одним из таких методов является фиторемедиация – очищение окружающей среды от различных поллютантов при помощи живых растений. В настоящее время наиболее распространенным методом фиторемедиации является фитоэкстракция, которая заключается в поглощении растениями поллютантов из почвы и концентрировании их в различных органах с последующей уборкой загрязненной фитомассы [4]. Понимание механизмов того, как растения способны детоксицировать металлы, имеет значение для расширения ряда растений, которые можно использовать для фиторемедиации [5]. Растения выработали механизмы, позволяющие справляться с токсичностью тяжелых металлов (связывание с клеточной стенкой, образование комплексов с органическими кислотами или пептидами), вакуолярная секвестрация (компарментализация) является одним из них. Интересно, что форма и объем вакуоли реагируют на токсические концентрации ТМ, что дополнительно указывает на участие этой органеллы в ответах растений на стресс. Токсические ионы ТМ, вероятно, мешают клеточным и молекулярным механизмам, связанным с вакуолярным биогенезом [6]. Вакуолярная секвестрация может достигаться либо фитохелатин-зависимым, либо фитохелатин-независимым путями. Большинство описанных в литературе трансгенных растений, предназначенных для фиторемедиации, являются результатом манипуляции генами, участвующими в фитохелатин-зависимом пути. Однако недавно появились данные, подтверждающие важность фитохелатин-независимого пути секвестрации тяжелых металлов в вакуоли, при этом важную роль играют металл/ H^+ -антипортеры и протонные насосы [7]. Показано, что активность интегральных белков – ферментов (АТФазы, десатуразы) зависит от липидного окружения, а именно от количества стеринового компонента мембраны [8]. Известно, что стеринны регулируют микровязкость, пластичность, ригидность, фазовый переход и характер липид-белкового взаимодействия в мембране [9]. Кроме того, стеринны принимают непосредственное участие в трансмембранной трансдукции сигналов внутрь клетки

посредством формирования в мембранах специфических липидных микродоменов [10]. Доказана роль стериннов и в защите от стрессовых воздействий. Так, например, показано, что при окислительном и осмотических видах стрессового воздействия изменения в содержании стериннов, были значительно более выражены на вакуолярной мембране по сравнению с плазмалеммой [9]. Известно, что фитостеринны – класс растительных веществ, относящихся к семейству тритерпеноидов, насчитывающих более двухсот собственно стериннов и более 4000 других типов тритерпенов. Тритерпены в свою очередь входят в группу вторичных метаболитов изопреноидов, которые представляют собой группу структурно разнообразных фитохимических веществ, связанных с первичным, а также вторичным метаболизмом [8, 11]. Известно, что изопреноиды выполняют функцию фитогормонов (абсцизовая кислота, цитокинины, гиббереллины, брассиностероиды), являются компонентами переносчиков электронов (цитохром *a*, хиноны), необходимы для фотосинтеза (каротиноиды, фитольная цепь в хлорофиллах), играют важную роль в химической защите растений и взаимодействии с окружающей средой, участвуют в мембранной проницаемости и текучести (стеринны). Таким образом, изопреноиды участвуют в регуляции процессов роста и развития, а также активно задействованы в формировании устойчивости растений к стрессовому воздействию. Интересно, что стеринны и тритерпеноиды синтезируются из одного общего предшественника – 2,3-оксидосквалена. В связи с этим существует гипотеза о конкуренции биосинтеза стериннов и тритерпенов в зависимости от экзо- и эндогенных процессов. Однако, учитывая решающую роль фитостеролов как компонентов мембран, было высказано предположение, что неограниченный биосинтез тритерпеноидов может происходить, когда образование стериннов уже удовлетворено, и эти соединения больше не нужны для роста и деления клеток [12].

Таким образом, анализ литературы свидетельствует о том, что понимание механизмов того, как растения способны поглощать, накапливать, перемещать, изолировать металлы имеет решающее значение для увеличения количества растений, которые можно использовать для фиторемедиации участков, загрязненных тяжелыми металлами. Некоторые из перечисленных механизмов взаимосвязаны с вакуолярной мембраной, в функционировании которой активно задействованы изопреноиды. В связи с этим целью данного исследования состояла в анализе качественного и количественного состава компонентов фракций стериннов тонопласта в ответ на стрессовое воздействие, вызванное ионами Cu^{2+} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.), выращенные на опытном участке СИФИБР СО РАН. Корнеплоды хранили в овощехранилище при +4°–5°C. Корнеплоды свеклы *Beta vulgaris* L. были выбраны в качестве объекта нашего исследования, потому что они являются запасующим органом, в вакуолях которого происходят интенсивные транспортные процессы, для выделения вакуолей из корнеплодов разработана методика получения чистой фракции вакуолей, к тому же корнеплоды хорошо хранятся, что дает возможность проводить эксперименты в течение длительного времени.

Условия стресса. Кусочки корнеплодов 1 см³ замачивали в растворе CuSO₄·5H₂O на 16 ч при комнатной температуре. Медь применяли в концентрациях 100 и 500 мкМ в пересчете на ионы, поскольку при этих концентрациях наблюдалось выраженное увеличение содержания диеновых конъюгатов и электролитов [13]. В контрольном варианте использовали дистиллированную воду.

Изолирование вакуолей. Выделение вакуолей из ткани корнеплодов проводили модифицированным макрообъемным методом, разработанным в лаборатории физиологии растительной клетки СИФИБР СО РАН [14]. Детали стандартных операций этого метода заключались в следующем: 600 г запасующей ткани корнеплодов *Beta vulgaris* L. нарезали специальным аппаратом в 800 мл среды изолирования (800 мМ KCl, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ NaH₂PO₄/KOH, pH 8.0). Раствор с нарезанной массой фильтровали (диаметр отверстия фильтра 400 мкм). Суспензию центрифугировали 15 мин при 250 g на центрифуге K-70 (“Janetzki”, ГДР). Затем осадок вакуолей ресуспендировали в 20 мл раствора, содержащего 1 М KCl, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl₂, 5 мМ трис – HCl, pH 7.4. Полученную суспензию центрифугировали 10 мин при 50 g на препаративной центрифуге K-23 (“Janetzki”, ГДР).

Получение вакуолярных мембран. Для получения вакуолярных мембран осадок вакуолей подвергали осмотическому шоку в гипотоническом растворе (1 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ трис-HCl, pH 7.4). Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 5000 g на препаративной центрифуге KR-22 (“JOUAN”, Франция). Надосадочную жидкость, содержащую везикулы тонопласта, центрифугировали 90 мин при 105000 g на препаративной центрифуге Sorvall Discovery 90SE (“Thermo”, Япония). Полученный осадок собирали и хранили во фризере при –80°C до начала проведения экспериментов.

Экстракция липидов. Общие липиды из тонопласта экстрагировали модифицированным методом Фолча [15]. Для экстракции липидов

из вакуолярных мембран использовали систему хлороформ – метанол (2:1 по объему). К выделенному тонопласту добавляли 5 мл экстрагирующей смеси и ионол в качестве антиоксиданта (из расчета 1.25 мг на 100 мл указанной смеси растворителей). Полученную суспензию гомогенизировали в течение 30 мин. Всего повторяли процедуру три раза. В делительную воронку с объединенным раствором добавляли воду и оставляли до расслаивания водной и органической фаз. Отбирали нижнюю фракцию, содержащую сумму липидных компонентов. Хлороформ из липидного экстракта удаляли под вакуумом с помощью роторного испарителя RV 8 V-C (“IKA”, Германия) или в токе аргона, а затем взвешивали на аналитических весах GH202 (“AND”, Япония) с точностью до 0.000001 г (гравиметрический метод).

Обнаружение и выделение компонентов стеринных фракций. Компоненты стеринных фракций (свободные стерины и эфиры стеринов) определяли с помощью одномерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-В (“ИМИД”, Россия). Для этого полученные липиды растворяли в хлороформе и наносили на пластинку. Пластины помещали в хроматографическую камеру с элюентом гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (80:20:1 об/об/об) [16]. Для обнаружения стеринных компонентов край пластины (0.5 см) обрабатывали 10% раствором серной кислоты в этаноле, а затем нагревали до 110°C. Стерины и их эфиры проявлялись на пластинке розово-голубыми пятнами, затем для них рассчитывали значения R_f [17]. Далее с необработанной пластины шпателем снимали сорбент (зоны стеринов и их эфиров), переносили в центрифужные пробирки (10 мл) и приливали по 1 мл хлороформа. После этого образцы интенсивно перемешивали на шейкере Works Minishaker Vortex Mixer MS1 S1 (“IKA”, Германия) и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин на центрифуге ЦЛК-1 (СССР). Экстракт переносили в стеклянные вials и удаляли хлороформ под током азота, чтобы избежать окисления. Для полноты выделения стеринов и их эфиров, к сорбенту, оставшемуся в пробирке, добавляли 1 мл этилацетата и повторяли экстракцию дважды. Для получения летучих производных, стеринов и эфиров стеринов, их подвергали силилированию [18]. К полученным стеринным фракциям тонопласта добавляли 150 мкл N,Обис(триметилсилил)ацетамида, 50 мкл гексаметилдисилазана (“Sigma-Aldrich”, США), 300 мкл этилацетата и 200 мкг эргостерина (“Sigma”, США) в качестве внутреннего стандарта, поскольку он не встречается в растениях. Смесь нагревали в течение 30 мин при 70°C в сушильном шкафу ШС-40-02 СПУ (“Смоленское СКТБ СПУ”, Россия).

Идентификация и количественный анализ компонентов стериновых фракций. Полученные триметилсилильные производные стеринов анализировали методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS Agilent Technologies (“Agilent”, США). Колонка HP-5MS, 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм со стационарной фазой метилполисилаксан. Температурная программа хроматографирования: при 70°C (1 мин), изотерма; далее программируемый нагрев до 280°C со скоростью 5°C/мин; при 280°C (5 мин), изотерма; далее программируемый нагрев до 300°C со скоростью 20°C/мин; при 300°C (3 мин), изотерма. Инжектор с делением потока 1:5. Температура инжектора 250°C, температура детектора 150°C, температура интерфейса 280°C. Газ-носитель – гелий, скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл. Хроматограмма образцов – по полному ионному току (SCAN). Условия масс-спектрометрического детектирования: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров положительных ионов в диапазоне (m/z) от 50 до 600 а.е.м. со скоростью 1.9 скан/сек.

Идентификацию компонентов свободных стеринов и их эфиров осуществляли при помощи стандартов, сравнением времени удерживания, и по библиотеке масс-спектров NIST08, Wiley7, с учетом фрагментных диагностических пиков, а также в соответствии со значениями хроматографического времени удерживания (Retention Time, RT) стандартных образцов. В качестве стандартных образцов использовали холестерин, стигмастерин, кампестерин (“Sigma”, США) и β -ситостерин (European pharmacopoeia reference standard, Франция). Относительное содержание (%) компонентов смеси (количественный анализ) вычислено из соотношения площадей хроматографических пиков (методом простого нормирования).

Статистический анализ данных. Для статистической обработки данных использовали программные пакеты Microsoft Excel и SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили в 3–5 независимых повторностях. Полученные данные представляли в виде медианы (Me), а разброс значений – в виде интерквартильной широты [25%; 75% процентиль]. С помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk) проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479-2002). Распределение отличалось от нормального, в связи, с чем для доказательства наличия значимых различий между медианами использовали H -критерий Краскела–Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента–Ньюмена–Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P < 0.05$ [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ стериновых фракций (СС и ЭФ) показал, что в исследуемом тонопласте в контроле и в условиях стресса (100 и 500 мкМ Cu^{2+}) присутствуют группы соединений относящихся к изопреноидам с циклопентанопергидрофенантеном в качестве остова. Известно, что по химической структуре стерина относятся к данной группе соединений [10]. В СС и ЭС были обнаружены соединения без двойной связи в структуре колец циклопентанопергидрофенантена и соединения с различными двойными связями в структуре колец циклопентанопергидрофенантена, а также группа стеринов с двойными связями в положении $\Delta 5$. В СС выявлена группа $\Delta 7$ -стеринов (6%), которая отсутствует в ЭС (табл. 1). В СС во всех исследуемых вариантах равный вклад в общее количество вносят соединения без двойной связи (33–35%) и группа $\Delta 5$ -стеринов (31–33%). Отмечено, что в ЭС как в контроле, так и при стрессе преобладают соединения без двойной связи (39–43%) и соединения с различными двойными связями (36–38%). Интересно, что содержание $\Delta 5$ -стеринов в ЭС всех вариантов ниже, чем в СС. Наблюдается снижение содержания соединений без двойной связи при 100 мкМ Cu^{2+} в СС и ЭС и увеличение при 500 мкМ Cu^{2+} . В таблице 2 представлены компоненты, обнаруженные во фракции свободных стеринов. Среди соединений без двойной связи достоверные изменения по сравнению с контролем были отмечены в содержании 7,8-эпоксиланостан-11-ол. При 100 мкМ Cu^{2+} происходило увеличение с 5.8% до 7.1% в контроле, в то время как при 500 мкМ Cu^{2+} количество снижалось до 6.9%. Также отмечено увеличение при 100 и 500 мкМ Cu^{2+} метил ((24-оксо-3,7,12-трис(триметилсилил)окси)холан-24-ил)амино)ацетата (табл. 2). Группа $\Delta 5$ -стеринов, которая составляет треть от всей суммы СС представлена холестерином, кампестерином, стигмастеином, β -ситостерином. Следует отметить, что β -ситостерин вносит весомый вклад в суммарное содержание СС, его количество составляло более 20% (% от суммы свободных стеринов). При 500 мкМ Cu^{2+} содержание β -ситостерина статистически значимо снижалось с 22.7% до 21.1% в контроле. Содержание кампестерина было достоверно выше при 100 мкМ Cu^{2+} по сравнению с контролем (табл. 2).

Компонентный состав фракции ЭС стеринов отличается от состава фракции СС (табл. 3). Так, в группе соединений без двойной связи идентифицированы прегнан-3,17,20,21-тетрол, (3 β ,5 α ,20R)-; холестано[7,8-а]циклобутан, 3-метокси-6-оксо-2'-метилен-. Не обнаружены такие соединения, как ланостан-3 β -ол, 11 β , 18-эпокси, ацетат; метил ((24-оксо-3,7,12-трис(триметилсилил)окси)холан-24-ил)амино)ацетат, которые были выявлены в составе СС (табл. 2). В группе соединений с различными

Таблица 1. Содержание компонентов фракции свободных стероидов и фракции эфиров стероидов в тонопласте в условиях стресса, вызванного ионами меди

Сумма соединений	Контроль		100 мкМ Cu ²⁺		500 мкМ Cu ²⁺	
	% от ΣСС	% от ΣЭС	% от ΣСС	% от ΣЭС	% от ΣСС	% от ΣЭС
Без двойной связи	35.3 [34.6; 35.5] ^{а,б,д}	43.2 [42.7; 43.4] ^{в,г,д}	33.2 [32.9; 34.2] ^{а,е}	39.9 [39.7; 40.6] ^{в,е}	36.7 [36.4; 36.8] ^{б,ж}	41.6 [41.2; 41.9] ^{г,ж}
С различными двойными связями	26.6 [25.2; 27.7] ^д	36.3 [35.9; 36.7] ^{в,д}	27.8 [26.2; 29.6] ^е	38.9 [38.3; 39.3] ^{в,е}	25.4 [25.3; 26.4] ^ж	36.9 [36.6; 37.7] ^ж
Δ5-стерины	33.5 [32.2; 34.1] ^д	20.5 [19.9; 21.4] ^д	32.5 [31.4; 33.5] ^е	21.1 [20.7; 21.3] ^е	31.3 [30.8; 31.8] ^ж	21.4 [20.7; 21.8] ^ж
Δ7-стерины	6 [5.9; 6.1]		5.9 [5.8; 6.2]		5.7 [5.6; 6.4]	

Примечание: СС – свободные стерины, ЭС – эфиры стероидов. *n* = 3–5. Отличия значимы (*P* < 0.05): а – между контролем и воздействием 100 мкМ Cu²⁺ во фракции СС; б – между контролем и воздействием 500 мкМ Cu²⁺ во фракции СС; в – между контролем и воздействием 100 мкМ Cu²⁺ во фракции ЭС; г – между контролем и воздействием 500 мкМ Cu²⁺ во фракции ЭС; д – между СС и ЭС в контроле; е – между СС и ЭС при 100 мкМ Cu²⁺; ж – между СС и ЭС при 500 мкМ Cu²⁺. Для доказательства наличия значимых различий между медианами Me [25%; 75%], использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента – Ньюмена – Кеулса.

Таблица 2. Содержание компонентов фракции свободных стероидов в тонопласте в условиях стресса, вызванного ионами меди, (%)

Соединения	Контроль		100 мкМ Cu ²⁺		500 мкМ Cu ²⁺	
	% от ΣСС	% от ΣЭС	% от ΣСС	% от ΣЭС	% от ΣСС	% от ΣЭС
Без двойных связей в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена	Этилизол-аллохолат Ланостан-3β-ол, 11β, 18-эпокси, ацетат 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- 17-(1,5-Диметилгексил)-10,13-диметил-3- стирилгексадекагидроциклопента[а]фенантрен-2-он Метил ((24-оксо-3,7,12-трис[(триметилсилил)окси]холоан- 24-ил)амино)ацетат	1.9 [1.8; 1.9] 17.1 [16.6; 17.2] 5.8 [5.5; 5.9] ^{а,б} 9.2 [9.2; 9.5]	1.9 [1.9; 1.9] ^в 13.3 [12.0; 14.7] ^в 7.1 [6.7; 7.3] ^а 8.8 [8.3; 9.4]	1.7 [1.5; 1.7] ^в 16.9 [16.9; 17.4] ^в 6.9 [6.8; 7.3] ^б 8.1 [7.8; 8.9]	2.0 [1.9; 2.3] ^б	9.9 [9.4; 10.1]
Различные двойные связи в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена	Ланоста-7,9(11)-диен-18-овая кислота, 3,20,25-тригидрокси-, γ-лактон Ланоста-7,9(11)-диен-3β,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)- Эргоста-7-ен-3-β-ол	6 [5.9; 6.1]	6.7 [6.7; 7.9]	17.5 [16.8; 18.9]	5.9 [5.8; 6.2]	5.7 [5.6; 6.4]
Δ7-стерины	Холестерин	1.8 [1.7; 2.4]	2.3 [2.1; 2.7]	3.0 [3.0; 3.6] ^{а,в}	2.4 [2.1; 2.7]	2.7 [2.5; 2.8] ^в
Δ5-стерины	Кампестерин	2.7 [2.6; 2.8] ^а	6.2 [6.1; 6.5]	21.4 [19.2; 21.8]	5.0 [4.5; 5.7]	21.1 [21.0; 21.2] ^б
	Стигмастерин	5.9 [4.8; 6.2]				
	β-ситостерин	22.7 [22.3; 23.5] ^б				

Примечание: *n* = 3–5. Отличия значимы (*P* < 0.05): а – между контролем и воздействием 100 мкМ Cu²⁺; б – между контролем и воздействием 500 мкМ Cu²⁺; в – между вариантами воздействием 100 мкМ Cu²⁺ на ткани и воздействием 500 мкМ Cu²⁺. Для доказательства наличия значимых различий между медианами Me [25%; 75%], использовали Н-критерий Краскела – Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента – Ньюмена – Кеулса.

Таблица 3. Содержание компонентов фракции эфиров стеринов в липидах тонопласта в условиях стресса, вызванного ионами меди, (%)

Соединения	Контроль	100 мкМ Cu ²⁺	500 мкМ Cu ²⁺
Без двойных связей в структуре колец цикlopentanопергидрофенантрена			
Этилизо-аллохолат	7.0 [6.8; 7.6] ^a	6.3 [5.5; 6.3] ^{a, b}	7.4 [7.1; 7.5] ^b
7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси-	14.0 [13.6; 14.4] ^b	13.9 [13.6; 13.9] ^b	12.9 [12.1; 13.0] ^{b, b}
17-(1,5-Диметилгексил)-10,13-диметил-3-стирилгексадекагидроциклопента[а]фенантрен-2-он	4.9 [4.7; 5.1]	5.1 [4.7; 5.7]	5.0 [4.7; 5.3]
Прегнан-3,17,20,21-тетрол, (3β,5α,20R)-	2.4 [2.0; 2.6]	2.9 [2.3; 3.0]	1.9 [1.8; 2.3]
Холестано[7,8-а]циклобутан, 3-метокси-6-оксо-2'-метилен-	13.9 [13.8; 15.2]	12.0 [11.9; 13.6]	14.7 [14.1; 15.6]
Различные двойные связи в структуре колец цикlopentanопергидрофенантрена			
Пропановая кислота, 2-(3-ацетокси-4,4,14-триметиландрост-8-ен-17-ил)-	21.2 [20.5; 21.9]	23.1 [22.5; 23.3]	22.9 [22.6; 24.2]
Ланоста-7,9(11)-диен-3β,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)-	14.4 [14.4; 15.5]	15.4 [15.0; 16.5]	13.4 [13.1; 14.0]
Δ5-стерины			
Холестерин	3.5 [3.3; 3.7]	3.0 [2.8; 3.1]	3.4 [3.2; 3.5]
Кампестерин	3.3 [2.9; 3.7]	3.8 [3.6; 3.9]	3.2 [3.2; 3.5]
Стигмастерин	5.1 [4.9; 6.6]	6.9 [6.1; 7.0]	7.0 [7.0; 7.1]
β-ситостерин	8.3 [7.7; 8.4]	7.6 [7.5; 8.2]	6.9 [6.6; 8.0]

Примечание: $n = 3-5$. Отличия значимы ($P < 0.05$): а – между контролем и воздействием 100 мкМ Cu²⁺; б – между контролем и воздействием 500 мкМ Cu²⁺; в – между вариантами воздействием 100 мкМ Cu²⁺ на ткани и воздействием 500 мкМ Cu²⁺. Для доказательства наличия значимых различий между медианами Me [25%; 75%], использовали Н-критерий Краскелла – Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента – Ньюмена – Кеулса.

двойными связями в ЭС присутствует пропановая кислота, 2-(3-ацетокси-4,4,14-триметиландрост-8-ен-17-ил)-, которая вносит наибольший вклад (21–23%) в суммарное содержание ЭС. В то время как в составе СС присутствует ланоста-7,9(11)-диен-18-овая кислота, 3,20,25-тригидрокси-, γ-лактон. Общее соединение в ЭС и СС ланоста-7,9(11)-диен-3β,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)-. Следует отметить, что содержание соединения этилизо-аллохолат было достоверно ниже при 100 мкМ Cu²⁺ (6.3 %) по сравнению с контролем (7%). Кроме этого, значимо снижались содержание соединения 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- с 14% в контроле до 12.9% при 500 мкМ Cu²⁺.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что фитостерины участвуют в защитных реакциях на такие стрессы как действие ТМ, засуха, УФ-излучение и температурные воздействия. Изменения в составе стеринового компонента влияют на функционирование мембран, метаболизм клетки и организм в целом. В связи с этим, значительная роль в процессах адаптации

принадлежит биосинтезу структурных липидов и изменению текучести мембран, которые, в свою очередь, связаны с содержанием стеринов [10, 20]. Недавно была показана роль стеринов тонопласта в ответ на окислительный стресс. Авторы работы отметили, что при окислительном стрессе происходило существенное увеличение содержания не только суммы стеринов тонопласта, но и всех отдельных классов стеринов [9]. Известно, что окислительный стресс возникает в результате действия практически всех неблагоприятных факторов внешней среды, включая засуху, почвенное засоление, загрязнение воздуха токсическими соединениями, такими как озон, оксиды серы, тяжелые металлы, неблагоприятные температуры и т.д. [10]. Ранее нами было доказано, что используемые в данном исследовании концентрации ионов меди (100 и 500 мкМ) вызывают развитие окислительного стресса. В этой работе также было показано, что происходило увеличение абсолютного суммарного содержания Δ5-стеринов при 100 мкМ Cu²⁺. Одновременно при 100 мкМ Cu²⁺ происходило увеличение отношение стигмастерина к β-ситостерину [13]. Согласно

литературным данным, соотношение стигмастерина к β -ситостерину в мембране может влиять на ответ растительных клеток на стрессовое воздействие [10]. В настоящем исследовании обнаружено, что $\Delta 5$ -стерины занимают не более 30% от общей суммы выявленных стеринных компонентов в СС и не более 20% в ЭС (табл. 1). Известно, что в растениях стеринны присутствуют не только в виде свободных стеринных, но и в конъюгированной форме: стерилгликозиды, ацилстерилгликозиды и эфиры стеринных. В ЭС гидроксильная группа в положении C_3 этерифицирована жирной кислотой. Содержание ЭС меняется в ответ на факторы окружающей среды. Считается, что эфиры стеринных, выполняют важную роль в поддержании физиологического пула и гомеостаза свободных форм стеринных в мембранах. Кроме этого, в некоторых тканях растений ЭС представляют собой хранилище стеринных необходимых для роста и развития растений [20–22]. Жирные кислоты, обнаруженные в ЭС, охватывают широкий диапазон длины цепи (от C_{12} до C_{22}). Стеринная часть в ЭС обычно соответствует тем же стеринам, которые присутствуют во фракции СС, но в некоторых тканях они могут содержать и другие стеринны, а также промежуточные продукты биосинтеза стеринных [20]. Качественный состав группы $\Delta 5$ -стеринны в СС и ЭС представлен холестеринном, кампестеринном, стигмастеринном, β -ситостеринном. Кампестерин и стигмастерин находились примерно на одном уровне, как в СС, так и в ЭС. В условиях стресса (100 и 500 мкМ Cu^{2+}) содержание эфиров стигмастерина в тонопласте увеличивалось (табл. 3). Известно, что стигмастерин участвует в стрессовых ответах растений [23]. Следует отметить, что в тонопласте при действии токсических концентраций ионов меди среди $\Delta 5$ -стеринных доминирующим был β -ситостерин. Согласно литературным данным, β -ситостерин участвует в синтезе стигмастерина, обладает высокой антиоксидантной активностью, является компонентом рафтовых структур, которые задействованы в сигналинге [10, 23]. Известно, что $\Delta 7$ -стеринны являются предшественниками $\Delta 5$ -стеринных [24, 25]. В настоящее время показано, что $\Delta 7$ -стеринны составляют более 10% от общего числа СС у растений, у отдельных видов растений $\Delta 7$ -стеринны были основными молекулярными типами стеринных и составляли 50–90% от общего числа компонентов стеринных [24]. В вакуолярной мембране при действии ионов меди (100 и 500 мкМ) $\Delta 7$ -стеринны были обнаружены только в СС (табл. 1). Отмечено, что количество $\Delta 7$ -стеринных было небольшим и не менялось в условиях стресса.

Тритерпеновые и стероидные гликозиды наряду со стероидными гликоалкалоидами образуют многочисленную и структурно разнообразную группу вторичных метаболитов растений, назы-

ваемых сапонинами. Сапонинны в зависимости от вида сапогенина делят на две группы: тритерпеновые и стероидные гликозиды, которые отличаются друг от друга по свойствам. Тритерпеновые сапонинны содержат 30 атомов углерода и в зависимости от числа карбоциклов подразделяются на тетрациклические и пентациклические. Тетрациклические тритерпеновые сапонинны условно делят на группы: производные даммарана, циклоартана, кукурбитана, ланостана и др. [26, 27]. Ланоста-7,9(11)-диен-3 β ,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)- ($C_{34}H_{54}O_5$) был обнаружен в СС и ЭС, и его содержание в ответ на стресс снижалось в обеих стеринных фракциях. Тритерпен ланостан-3 β -ол, 11 β , 18-эпокси, ацетат является доминирующим представителем группы соединений без двойных связей в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена во фракции СС, содержание которого снижается при стрессе. Отмечено, что во фракции ЭС он отсутствует. Однако в СС в группе соединений с различными двойными связями в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена присутствует также соединение ланоста-7,9(11)-диен-18-овая кислота, 3,20,25-тригидрокси-, γ -лактон в небольшом количестве, которое повышалось в тонопласте при действии ионов меди. Происходило повышение содержания соединения 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- во фракции СС при стрессе, в то время как в ЭС содержание этого соединения снижалось. Интересно, что 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- вносит большой вклад в содержание соединений без двойных связей в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена в ЭС (табл. 3). Известно, что производные тритерпенов – сапонинны влияют на проницаемость липидного бислоя. Их взаимодействие с молекулами холестерина приводит к образованию нерастворимых комплексов, образующих особые мембранные поры, что в свою очередь приводит к увеличению проницаемости бислоя [28].

В другой работе показано, что тритерпены женьшеня в модельных мембранах связываются с обоими монослоями. Отмечено, что их количество больше в неупорядоченной фазе бислоя, чем в упорядоченной фазе [29]. В ЭС одним из доминирующих соединений являлась пропановая кислота, 2-(3-ацетокси-4,4,14-триметиландрост-8-ен-17-ил). Данное соединение относится к летучим органическим соединениям и является активным вторичным метаболитом [30]. Кроме пропановой кислоты, в ЭС обнаружен этилизо-аллохолат, причем его содержание было больше, чем в СС. При этом в условиях 100 мкМ Cu^{2+} оно снижалось, а при 500 мкМ Cu^{2+} увеличивалось (табл. 3). Во фракции СС наблюдалась обратная ситуация. Возможно, в данном случае СЭ этилизо-аллохолата являются путем для этилизо-аллохолата в СС. Известно, что этилизо-аллохолат – стероидное производное,

которое обладает антиоксидантными, противовоспалительными, антибактериальными и противомикробными свойствами [31]. Интересно также, что содержание соединения 17-(1,5-диметилгексил)-10,13-диметил-3-стирилгексадекагидроциклопента[а]фенантрен-2-он в СС в условиях стресса снижалось, а в ЭС повышалось. По литературным данным информации об этом соединении практически нет. Следует отметить, что в ЭС обнаружено соединение холестано[7,8-а]циклобутан, 3-метокси-6-оксо-2'-метиле-, которого нет в СС. По литературным данным, циклобутаны все чаще применяются в медицинской химии. Циклобутаны использовались для улучшения множества факторов, таких как предотвращение *цис/транс*-изомеризации путем замены алкенов и более крупных циклических систем, повышения метаболической стабильности, направления ключевых фармакофорных групп, индукции конформационных ограничений и заполнения гидрофобных карманов [32].

Анализ полученных данных показывает, что содержание Δ^5 -стеринов в вакуолярной мембране занимает не более 33% и в условиях стресса (100 и 500 мкМ Cu^{2+}) их содержание снижается. Однако во многих исследованиях внимание уделяется именно этой группе стероидов, так как они в основном играют в мембране структурную роль [10, 25]. Интересно, что в СС преобладали соединения тритерпенового ряда и в общей сумме составляют более 47% причем при 500 мкМ Cu^{2+} их суммарное содержание увеличивалось до 50% (табл. 2). По литературным данным тритерпеновые сапонины влияют на проницаемость мембраны. Ранее нами было показано, что действие 100 и 500 мкМ Cu^{2+} увеличивало выход электролитов, что говорит об увеличении проницаемости мембран [13]. Следует упомянуть, что вторичные метаболиты играют важную роль в физиологии стресса растений. При этом увеличивается их количество. Показано, что Cu^{2+} стимулировал продукцию вторичных метаболитов у *Beta vulgaris* L. [33]. Выше упоминалось, что в ЭС могут присутствовать промежуточные продукты биосинтеза стероидов, имеющие биологическую активность. В настоящем исследовании в ЭС обнаружены соединения с высокой биологической активностью, суммарное содержание которых увеличивалось в условиях стресса, особенно при 500 мкМ Cu^{2+} (табл. 3).

Таким образом, в результате исследования выявлено многообразие компонентов в составе стероидных фракций вакуолярной мембраны, которые определяют биофизические характеристики мембраны и обладают биологической активностью. Полученные результаты могут быть связаны со способностью вакуолярной мембраны принимать участие в адаптационных механизмах растительной клетки. Выявленные соединения реа-

гировали на токсическое воздействие ионов Cu^{2+} , что можно рассматривать как один из механизмов защиты растительной клетки от стресса.

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Н.В. Семеновой (СИФИБР СО РАН, г. Иркутск) за помощь в идентификации компонентов стероидных фракций.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-26-00208, <https://rscf.ru/project/23-26-00208/> на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mir A.R., Pichtel J., Hayat S. Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil // *Biometals*. 2021. V. 34. P. 737. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00306-z>
2. Румянцев В.А., Пухальский Я.В., Лоскутов С.И., Митюков А.С., Хомяков Ю.В., Панова Г.Г. Влияние ультрадисперсной гуминовой суспензии сапропеля на рост, фотосинтетическую активность и накопление меди горохом (*Pisum sativum* L.) // Доклады РАН. Науки о земле. 2021. Т. 501. № 1. С. 86. <https://doi.org/10.31857/S268673972111013X>
3. Adrees M., Shafaqat A., Rizwan M., Ibrahim M., Abbas F., Farid M., Zia-ur-Rehman M., Irshad M.K., Bharwana S.A. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review // *Environ Sci. Pollut Res*. 2015. V. 22. P. 8148. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>
4. Курейчева Л.В., Ильинский А.В., Яшин В.М. К вопросу фиторемедиации почв, загрязненных комплексом тяжелых металлов // Мелиорация и водное хозяйство. 2016. № 4. С. 8.
5. Sharma J.K., Kumar N., Singh N.P., Santal A.R. Phytoremediation technologies and their mechanism for removal of heavy metal from contaminated soil: An approach for a sustainable environment // *Front. Plant Sci*. 2023. V. 14. P. 1076876. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1076876>
6. Sharma S.S., Dietz K.J., Mimura T. Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants // *Plant Cell Environ*. 2016. V. 39. P. 1112. <https://doi.org/10.1111/pce.12706>
7. Khoudi H. Significance of vacuolar proton pumps and metal/ H^+ antiporters in plant heavy metal tolerance // *Physiol. Plant*. 2021. V. 173. P. 384. <https://doi.org/10.1111/ppl.13447>

8. Дадали В.А., Тутельян В.А. Фитостерины-биологическая активность и перспективы практического применения // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. № 5. С. 458.
9. Озолина Н.В., Гурина В.В., Капустина И.С., Спиридонова Е.В., Нурминский В.Н. Сравнение изменений в содержании стеринах плазмалеммы и тонопласта при окислительном и осмотических стрессах // Биологические мембраны. 2023. Т. 40. № 2. С. 147. <https://doi.org/10.31857/S0233475523020056>
10. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минабаева Ф.В. Растительные стеринны: многообразие, биосинтез, физиологические функции // Биохимия. 2016. Т. 81. № 8. С. 1050. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
11. Ренкова А.Г., Хабибрахманова В.Р., Валитова Ю.Н., Мухитова Ф.К., Минабаева Ф.В. Действие стрессовых фитогормонов на метаболизм стеринах *Triticum aestivum* L. // Физиология растений. 2021. Т. 68. С. 279. <https://doi.org/10.31857/S0015330321020159>
12. Rogowska A., Szakiel A. Enhancement of phytosterol and triterpenoid production in plant hairy root cultures-simultaneous stimulation or competition? // Plants. 2021. V. 10. P. 2028. <https://doi.org/10.3390/plants10102028>
13. Спиридонова Е.В., Капустина И.С., Гурина В.В., Семёнова Н.В., Озолина Н.В. Изучение влияния ионов меди на состав фитостеринах вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* L. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. № 1. С. 76. <https://doi.org/110.21285/achb.902 EDN: MAEZIW>
14. Салеев Р.К., Кузеванов В.Я., Хантагаев С.Б., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // Физиология растений. 1981. Т. 28. С. 1295.
15. 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. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
16. Malins D.C., Mangold H.K. Analysis of complex lipid mixtures by thin layer chromatography and complementary methods // J. Americ. Oil Chem. Soc. 1960. V. 37. P. 576.
17. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. Москва. Мир, 1975. 324 с.
18. Дударева Л.В., Семенова Н.В., Нохсоров В.В., Рудиковская Е.Г., Петров К.А. Компонентный состав фитостеринах надземной части хвоща пестрого *Equisetum variegatum* Schleich. ex. Web., произрастающего в северо-восточной Якутии // Химия растительного сырья. 2020. Т. 2. С. 133. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020025555>
19. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика, 1999. 459 с.
20. Du Y., Fu X., Chu Y., Wu P., Liu Y., Ma L., Tian H., Zhu B. Biosynthesis and the roles of plant sterols in development and stress responses // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 2332. <https://doi.org/10.3390/ijms23042332>
21. Ferrer A., Altabella T., Arró M., Boronat A. Emerging roles for conjugated sterols in plants // Progress in lipid research. 2017. V. 67. P. 27. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.06.002>
22. Silvestro L.D., Andersen T.G., Schaller H., Jensen P.E. Plant sterol metabolism. D7-sterol-C5-desaturase (STE1/DWARF7), D 5,7-sterol-D7-reductase (DWARF5) and D24-sterol-D24-reductase (DIMINUTO/DWARF1) show multiple subcellular localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. // PLoS One. 2013. V. 8. P. 56429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056429>
23. Валитова Ю.Н., Ренкова А.Г., Минабаева Ф.В. β-ситостерин – природный антиоксидант // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 2. С. 150. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-150-156>
24. Rozentsvet O.A., Kotlova E.R., Bogdanova E.S., Nesterov V.N., Senik S.V., Shavarda A.L. Balance of Δ5-and Δ7-sterols and stanols in halophytes in connection with salinity tolerance // Phytochem. 2022. V. 198. P. 113156. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113156>
25. Семёнова Н.В., Шмаков В.Н., Константинов Ю.М., Дударева Л.В. Сравнительный анализ состава стеринах эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica* ledeb // Физиология растений. 2023. Т. 70. P. 181. <https://doi.org/10.31857/S0015330322600516>
26. Фаттахова Г.А., Канарский А.В. Сапонины как биологически активные вещества растительного происхождения // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 3. С. 196.
27. Давидянц Э.С. Тритерпеновые гликозиды как регуляторы роста растений: потенциал и перспективы использования // Химия растительного сырья. 2023. № 1. С. 5. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20230111368>
28. Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins // Phytochem. 2011. V. 72. P. 435. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
29. Garza D.L., Hanashima S., Umegawa Y., Murata M., Kinoshita M., Matsumori N., Greimel P. Behavior of triterpenoid saponin ginsenoside Rh2 in ordered and disordered phases in model membranes consisting of sphingomyelin, phosphatidylcholine, and cholesterol // Langmuir. 2022. V. 38. P. 10478. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c01261>
30. Saranya R., Aarathi R., Sankaran K. Simple and specific colorimetric detection of *Staphylococcus* using its volatile 2-[3-acetoxy-4,4,14-trimethylandro-8-en-17-yl] propanoic acid in the liquid phase and head space of cultures // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 4423. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6573-6>
31. Thakur R.S., Ahirwar B. A steroidal derivative from *Trigonella foenum graecum* L. that induces apoptosis in vitro and in vivo // J. Food Drug. Anal. 2019. V. 27. P. 231. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.05.001>
32. van der Kolk M.R., Janssen M.A.C.H., Rutjes F.P.J.T., Blanco-Ania D. Cyclobutanes in small-molecule drug candidates // Chem. Med. Chem. 2022. V. 17. e202200020. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200020>
33. Ramakrishna A., Ravishankar G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // Plant Signal. Behav. 2011. V. 6. P. 1720. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>

УДК 581.1+582.711.16+547.814.5

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ *Rhodiola algida* (Ledeb.) Fisch. & С.А. Меу.: НОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ГЕРБАЦЕТИНА, ВЭЖХ-МС ПРОФИЛЬ И ОРГАН-СПЕЦИФИЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ¹

© 2024 г. Д. Н. Оленников^а*, А. С. Прокопьев^б^аИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047, Россия^бСибирский ботанический сад Томского государственного университета, Томск, 634050, Россия

*e-mail: olennikovdn@mail.ru

Поступила в редакцию 13.02.2024 г.

После доработки 25.02.2024 г.

Принята к публикации 27.02.2024 г.

Фенольные соединения рода *Rhodiola* (*Crassulaceae*) являются предметом многочисленных исследований, однако основное число сведений литературы касается анализа корней и корневищ, в связи с чем метаболиты надземных органов мало изучены. *Rhodiola algida* (Ledeb.) Fisch. & С.А. Меу. – редкий и малоизученный вид рода, произрастающий в Алтае-Саянском регионе. В результате хроматографического разделения компонентов экстракта цветков *R. algida* были впервые выделены 16 известных соединений, среди которых галловая кислота, гликозиды гербацетина, госсипетина, гибисцетина, кверцетина и кемпферола, а также 4 новых флавоноида (I–IV). С применением данных УФ, ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии и химических превращений было установлено, что новые соединения представляли собой гербацетин 7-*O*-β-*D*-глюкопиранозид-8-*O*-(2'''-*O*-β-*D*-глюкопиранозил)-β-*D*-глюкуронопиранозид (родиалгин А, I), гербацетин 3-*O*-β-*D*-глюкопиранозид-8-*O*-(2'''-*O*-ацетил)-α-*L*-арабинопиранозид (родиалгин В, II), гербацетин 3-*O*-β-*D*-глюкопиранозид-8-*O*-(4'''-*O*-ацетил)-α-*L*-арабинопиранозид (родиалгин С, III) и гербацетин 8-*O*-(4''-*O*-ацетил)-β-*D*-ксилопиранозид (родиалгин D, IV). Использование жидкостной хромато-масс-спектрометрии позволило выявить присутствие в *R. algida* 96 метаболитов, среди которых доминировали гликозиды гербацетина и госсипетина. Качественный состав и количественное содержание групп и отдельных соединений в различных органах *R. algida* отличались в широком диапазоне значений, указывая на орган-специфичную особенность накопления фенольных соединений в растении.

Ключевые слова: *Rhodiola algida*, *Crassulaceae*, флавоноиды, гербацетин, жидкостная хроматография масс-спектрометрия (ЖХ-МС), орган-специфичное распределение

DOI: 10.31857/S0015330324040084, EDN: MNKQLY

ВВЕДЕНИЕ

Род *Rhodiola* (*Crassulaceae*) включает более 70 видов, большинство из которых имеют Евразийский ареал и обладают хозяйственным значением в качестве лекарственных растений [1]. Фенольные соединения данного рода являются предметом пристального интереса ученых ввиду наличия у них различных видов биологической активности, в том числе адаптогенной, иммуностимулирующей, антимикробной и других [2]. Особый интерес среди фенолов рода вызывают флавоноиды, которые в большей части принадлежат к редкой группе 8-гидрокси-флавонолов,

включая производные гербацетина, госсипетина и гибисцетина, выполняющие функции сигнальных молекул, УФ-фильтров и влияющие на устойчивость растений к засухе, жаре и заморозкам [3]. Среди многообразия видов *Rhodiola*, произрастающих в России, интерес представляют те, которые являются источником уникальных фенольных соединений. К числу таких видов относится *Rhodiola algida* (Ledeb.) Fisch. & С.А. Меу – алтае-саянский эндемик, который в настоящее время вводится в культуру [4]. Известные сведения о химическом составе *R. algida* касаются только компонентов подземных органов растения, в которых были обнаружены и определена структура 8 гликозидов гербацетина – родалгин, ацетилродалгин, диацетилродалгин, триацетилродалгин [5], родалин, ацетилродалин [6], родалид [7], а также показано

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324040084

Сокращения: ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС – высокоэффективная хроматография с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием с ионизацией электрораспылением.

присутствие двух неидентифицированных флавоноидов родалгизина и родалгизид [7]. Данные о химическом составе надземных органов *R. algida* отсутствуют.

Цель работы – определить групповой состав фенольных соединений *R. algida*, выделить основные соединения и провести хроматографическое профилирование надземных органов с применением метода жидкостной хроматографии масс-спектрометрии (ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общие экспериментальные условия. Надземные органы (листья, цветки, стебли) *R. algida* были собраны в фазу цветения в различных районах России и Монголии в 2021–2022 гг.: окрестности поселка Красная Гора, Усть-Коксинский р-н, Республика Алтай, 50°04'11.7"N 85°14'13.7"E; Саянский перевал, Таштыпский р-н, Республика Хакасия, 51°42'16.6"N 89°52'51.1"E; окрестности сомона Сагсай, Баян-Улэгэйский аймак, Монголия, 48°14'58.7"N 88°57'12.3"E, и высушены при 40°C до влажности ≤ 5% в конвекционном сушильном шкафу ПРО ШСП-У 35/150-120 (ООО “Новые технологии”, Россия). Семена и корни растений собирали в сентябре 2021–2022 гг. на тех же природных участках. Для выделения соединений цветки *R. algida* использовали свежими. Для колоночной хроматографии использовали полиамид, нормально- (SiO_2) и обращенно-фазовый силикагель (ОФ- SiO_2), Сефадекс LH-20 (“Sigma-Aldrich”, Сент-Луис, США). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (“ОКБ Спектр”, Россия). Масс-спектры регистрировали на ТQ-масс-спектрометре LCMS-8050 (“Shimadzu”, Япония) [8], спектры ЯМР – на спектрометре VXR 500S (“Varian”, США). Препаративную ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (“Shimadzu”), снабженном колонкой Shim-pak PREP-ODS (20 мм × 250 мм × 15 мкм) и фотодиодным детектором SPD-M30A (“Shimadzu”); при скорости – 1 мл/мин и температуре колонки 20°C.

Количественный анализ групп фенольных соединений. Содержание групп фенольных соединений в образцах органов *R. algida* определяли спектрофотометрическим методом, используя известные методики: флавонолы – дифференциальная спектрофотометрия с алюминия (III) хлоридом в пересчете на гербацетина 3,8-ди-*O*-глюкозид (≥95%, № CDX-00008102; “LGC Ltd.”, Великобритания) [9], галлотаннины – после метанолиза и окисления с KIO_3 в пересчете на 1-*O*-галлоил глюкозу (≥98%, № MG13684; “Biosynth Ltd.”, Великобритания) [10], процианидины – по реакции с 4-диметиламинокорич-

ным альдегидом в пересчете на процианидин В1 с применением набора Proanthocyanidins Assay Kit (№ KB03017; “BQC Redox Technologies”, Испания), катехины – по реакции с ванилином в пересчете на (+)-катехин (≥99%, № 43412; “Sigma-Aldrich”, Сент-Луис, США) [11] и антоцианы – рН дифференциальная спектрофотометрия в пересчете на цианидин-3-*O*-глюкозид (≥98%, № PHL89616; “Sigma-Aldrich”, Сент-Луис, США) [12].

Выделение соединений из цветков *R. algida*.

Свежие цветки *R. algida* (2 кг) измельчали в гомогенизаторе с изопропанолом (1:3), после чего добавляли растворитель до соотношения 1:15 и экстрагировали при 40°C в ультразвуковой ванне (2 ч, ×3). Объединенный экстракт фильтровали и концентрировали досуха. Получено 105 г экстракта, который разделяли на полиамиде (5 кг), при элюировании водой (фракция 1, 35 г), 60% этанолом (фракция 2, 22 г) и 0.5% NH_3 в 90% этаноле (фракция 3, 31 г). Концентрация фенольных соединений во фракции 1 была следовой, поэтому дальнейшее разделение было осуществлено для фракций 2 и 3, которые хроматографировали методом флэш-хроматографии на Сефадексе LH-20 (2 × 90 см, элюент этанол–вода 90:10 → 50:50), ОФ- SiO_2 (2 × 40 см, элюент вода–ацетонитрил 80:20 → 20:80) и SiO_2 (3 × 40 см, элюент этилацетат–этанол 100:0 → 60:40). Соединения с близкими временами удерживания разделяли, используя препаративную ВЭЖХ в градиентном режиме (элюент А – вода, элюент В – ацетонитрил; программа элюирования: 0–15 мин 10–30% В в А, 15–80 мин 30–70% В в А, 80–120 мин 70–100% В в А). В результате было выделено 16 известных соединений, включая галловую кислоту (750 мг), госсипетин 3-*O*-глюкозид (80 мг), гербацетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-ксилозид (родалидин, 250 мг), гербацетин 8-*O*-арабинозид (родалгин, 40 мг), кверцетин 3-*O*-рамнозид (кверцитрин, 25 мг), кемпферол 4'-*O*-глюкозид (15 мг) и кемпферол 3-*O*-рамнозид (афцелин, 10 мг) из фракции 2, и госсипетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-глюкуронид (310 мг), госсипетин 3-*O*-глюкуронид (35 мг), госсипетин 8-*O*-глюкуронид (15 мг), гербацетин 8-*O*-(2''-*O*-глюкозил)-глюкуронид (родиквадрин С, 80 мг), гербацетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-глюкуронид (1.4 г), гербацетин 3-*O*-глюкуронид (20 мг), гербацетин 8-*O*-глюкуронид (мелокорин, 250 мг), гибисцетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-глюкуронид (1.1 г) и гербацетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-(2''-*O*-ацетил)-ксилозид (120 мг), идентифицированных по данным УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии [5, 6, 8]. Из фракции ТФЭ-3 также были выделены 4 новых соединения, в том числе родиалгин А (420 мг; I), родиалгин В (105 мг; II), родиалгин С (50 мг; III) и родиалгин D (40 мг; IV).

Гербацетин 7-*O*-β-*D*-глюкопиранозид-8-*O*-(2'''-*O*-β-*D*-глюкопиранозил)-β-*D*-глюкуронопиранозид (родиалгин А, I). C₃₃H₃₈O₂₃. УФ-спектр (MeOH, I_{max}, нм): 271, 294, 353. HR-ESI-MS, *m/z*: 803.514 [M + H]⁺ (расч. 803.652 для C₃₃H₃₉O₂₃ [M + H]⁺). ESI-MS, *m/z* (%): 803 (100) [M + H]⁺, 641 (49) [(M + H)-глюкоза]⁺, 479 (27) [(M + H)-2 × глюкоза]⁺, 303 (36) [(M + H)-2 × глюкоза-глюкуроновая кислота]⁺.

Гербацетин 3-*O*-β-*D*-глюкопиранозид-8-*O*-(2'''-*O*-ацетил)-α-*L*-арабинопиранозид (родиалгин В, II). C₂₈H₃₀O₁₇. УФ-спектр (MeOH, I_{max}, нм): 269, 355. HR-ESI-MS, *m/z*: 639.508 [M + H]⁺ (расч. 639.539 для C₂₈H₃₁O₁₇ [M + H]⁺). ESI-MS, *m/z* (%): 803 (100) [M + H]⁺, 597 (50) [(M + H)-ацетил]⁺, 465 (55) [(M + H)-ацетил-арабиноза]⁺, 303 (28) [(M + H)-ацетил-арабиноза-глюкоза]⁺.

Гербацетин 3-*O*-β-*D*-глюкопиранозид-8-*O*-(4'''-*O*-ацетил)-α-*L*-арабинопиранозид (родиалгин С, III). C₂₈H₃₀O₁₇. УФ-спектр (MeOH, I_{max}, нм): 269, 355. HR-ESI-MS, *m/z*: 639.489 [M + H]⁺ (расч. 639.539 для C₂₈H₃₁O₁₇ [M + H]⁺). ESI-MS, *m/z* (%): 803 (100) [M + H]⁺, 597 (46) [(M + H)-ацетил]⁺, 465 (44) [(M + H)-ацетил-арабиноза]⁺, 303 (26) [(M + H)-ацетил-арабиноза-глюкоза]⁺.

Гербацетин 8-*O*-(4'''-*O*-ацетил)-β-*D*-ксилопиранозид (родиалгин D, IV). C₂₂H₂₀O₁₂. УФ-спектр (MeOH, I_{max}, нм): 271, 325, 373. HR-ESI-MS, *m/z*: 477.214 [M + H]⁺ (расч. 477.398 для C₂₂H₂₁O₁₂ [M + H]⁺). ESI-MS, *m/z* (%): 477 (100) [M + H]⁺, 435 (55) [(M + H)-ацетил]⁺, 303 (16) [(M + H)-ацетил-ксилоза]⁺.

Гидролиз. Кислотный гидролиз в 2 М ТФУ и последующий анализ продуктов гидролиза проводили как описано ранее [13].

Высокоэффективная хроматография с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием с ионизацией электрораспылением (ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС). Анализ осуществляли на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA), соединенном с диодно-матричным детектором (ДМД) и 3Q-детектором с ионизацией электрораспылением (ИЭР/МС; electrospray ionization, ESI), используя колонку ReproSil-Pur 120 C18-AQ (250 мм × 4,6 мм × 5 мм; Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany). Условия ВЭЖХ: подвижная фаза, элюент А – вода, элюент В – ацетонитрил; программа градиента – 0–20 мин 2–80% В, 20–30 мин 80–100% В, 30–35 мин 100% В, 35–40 мин 100–2% В; инжектируемый объем – 1 мкл; скорость потока – 1 мл/мин, температура колонки – 30°C; диапазон сканирования спектров поглощения – 200–600 нм. Условия ИЭР-МС: режим ионизации – электрораспыление, положительная ионизация; температура интерфейса ИЭР – 300°C; температура линии десольватации – 250°C; температура нагревательного блока – 400°C; скорость газа-распыли-

теля (N₂) – 3 л/мин; скорость газа-нагревателя (воздух) – 10 л/мин; давление газа, используемого для диссоциации, индуцируемой соударением (CID gas, Ar) – 270 кПа; скорость Ar – 0.3 мл/мин; напряжение на капилляре – 3 кВ; диапазон сканирования масс (*m/z*) 100–1900. Количественный анализ индивидуальных соединений проводили по разработанной ранее методике, использующей ВЭЖХ-МС метод [8]. Для построения градуировочных графиков серию разведений веществ сравнения (1–100 мкг/мл) хроматографировали в описанных выше условиях трижды для каждой концентрации вещества. По полученным данным проводили построение градуировочного графика в координатах “концентрация, мкг/мл – площадь пика” с применением пакета программ Advanced Grapher v. 2.2 (Alentum Software, Inc., США).

Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значимость различий средних определяли с помощью многогранового теста Дункана. Отличия при *P* < 0.05 считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Учитывая сведения о метаболитах рода *Rhodiola* [1], был проведен количественный анализ сырья на присутствие пяти групп соединений, включая флавонолы, галлотаннины, процианидины, катехины и антоцианы (табл. 1). Исследование образцов *R. algida* из трех мест произрастания показало, что различные органы характеризовались разными уровнями накопления веществ. Суммарное содержание фенольных соединений в воздушно-сухом сырье варьировало в диапазонах 33.41–76.11 мг/г для цветков, 30.42–50.73 мг/г для листьев, 4.00–7.94 мг/г для стеблей, до 0.92 мг/г в семенах и 40.03–70.61 мг/г для корней. Флавонолы были основной группой фенолов в цветках (24.05–62.11 мг/г) в сравнении с галлотаннинами (5.29–11.26 мг/г) и антоцианами (2.04–2.73 мг/г), а концентрации процианидинов и катехинов оценивались как следовые. В листьях отмечено отсутствие антоцианов и значительно меньшее содержание флавонолов (9.26–32.84 мг/г), чем в цветках, но большее содержание галлотаннинов (14.63–26.11 мг/г) и следовые уровни процианидинов (0.65–1.22 мг/г) и катехинов (0.29–0.85 мг/г). Для стеблей была возможной количественная оценка для флавонолов (0.93–5.79 мг/г) и галлотаннинов (2.15–3.27 мг/г), а в семенах все изученные группы соединений находились в следовых концентрациях или отсутствовали, кроме флавонолов в популяции из Республики Алтай (0.92 мг/г). Танины были доминирующими компонентами в корнях *R. algida*, причем содержание гал-

лотаннинов составило 25.83–27.63 мг/г, а процианидинов – 7.29–22.73 мг/г. Концентрации флавонолов и катехинов в образцах корней не превышали 15.16 мг/г и 5.83 мг/г соответственно. Полученные данные свидетельствовали о различной способности к накоплению фенольных соединений разными органами *R. algida*, причем впервые отмечены высокие концентрации флавонолов в надземных органах растения. Ранее сходный факт был выявлен для *R. rosea* [8] и некоторых других видов *Rhodiola* [14], что возможно, является биохимической особенностью рода.

Учитывая высокое содержание фенольных соединений в цветках *R. algida*, из них был получен экстракт, изученный с применением комплекса хроматографических методов, включая флэш хроматографию на полиамиде, Сефадексе LH-20, обращенно- и нормально-фазовом силикагеле и препаративной ВЭЖХ. Это привело к выделению 16 известных соединений, в том числе галловой кислоты, 7 гликозидов гербацети-

на, включая гербацетин 3-*O*-гликозид-8-*O*-ксилозид (родалидин), гербацетин 8-*O*-арабинозид (родалгин), гербацетин 3-*O*-гликозид-8-*O*-глюкуронид, гербацетин 3-*O*-глюкуронид, гербацетин 8-*O*-глюкуронид (мелокорин), гербацетин 3-*O*-гликозид-8-*O*-(2''-*O*-ацетил)-ксилозид и гербацетин 8-*O*-(2''-*O*-глюкозил)-глюкуронид (родиквадрин С), 4 гликозидов госсипетина, среди которых госсипетин 3-*O*-гликозид, госсипетин 3-*O*-глюкуронид, госсипетин 8-*O*-глюкуронид, госсипетин 3-*O*-гликозид-8-*O*-глюкуронид, а также гибисцетин 3-*O*-гликозид-8-*O*-глюкуронида, кверцетин 3-*O*-рамнозида (кверцитрин), кемпферол 4'-*O*-гликозида и кемпферол 3-*O*-рамнозида (афцелин). Ранее родалгин был обнаружен в корнях *R. algida* [5], остальные соединения выявлены впервые для вида. Кроме известных соединений были выделены четыре новых флавонол-*O*-гликозида I–IV, в продуктах гидролиза которых с 2 М ТФУ были идентифицированы гербацетин (3,5,7,8,4'-пентагидроксифлавонол, I–IV), D-глюкоза (I–III),

Таблица 1. Содержание групп фенольных соединений (ФС) в органах *R. algida*, мг/г воздушно-сухой массы \pm S.D.

Группа соединений	Цветки	Листья	Стебли	Семена	Корни
Республика Алтай (n = 24)					
Флавонолы	62.11 \pm 3.10	32.84 \pm 1.77	5.79 \pm 0.34	0.92 \pm 0.04	15.16 \pm 0.84
Галлотаннины	11.26 \pm 0.67	15.82 \pm 0.68	2.15 \pm 0.12	сл.	26.89 \pm 1.23
Процианидины	сл.	1.22 \pm 0.06	сл.	сл.	22.73 \pm 1.04
Катехины	сл.	0.85 \pm 0.05	сл.	сл.	5.83 \pm 0.26
Антоцианы	2.73 \pm 0.12	–	–	–	–
Суммарное содержание ФС	76.11	50.73	7.94	0.92	70.61
Республика Хакасия (n = 14)					
Флавонолы	43.02 \pm 2.23	14.85 \pm 0.82	2.83 \pm 0.14	сл.	7.27 \pm 0.45
Галлотаннины	5.29 \pm 0.22	14.63 \pm 0.92	3.27 \pm 0.16	сл.	25.83 \pm 0.87
Процианидины	сл.	0.65 \pm 0.03	сл.	сл.	14.86 \pm 0.68
Катехины	сл.	0.29 \pm 0.01	сл.	сл.	2.83 \pm 0.14
Антоцианы	2.04 \pm 0.10	–	–	–	–
Суммарное содержание ФС	50.35	30.42	6.10	сл.	50.79
Монголия (n = 9)					
Флавонолы	24.05 \pm 0.76	9.26 \pm 0.31	0.93 \pm 0.04	сл.	5.11 \pm 0.25
Галлотаннины	6.83 \pm 0.31	26.11 \pm 1.20	3.07 \pm 0.14	сл.	27.63 \pm 1.41
Процианидины	сл.	сл.	сл.	сл.	7.29 \pm 0.32
Катехины	сл.	сл.	сл.	сл.	–
Антоцианы	2.52 \pm 0.14	–	–	–	–
Суммарное содержание ФС	33.41	35.37	4.00	сл.	40.03

Примечание. Сл. – следы (< 0.01 мг/г). Прочерк (–) означает отсутствие.

D-глюкуроновая кислота (I), L-арабиноза (II, III) и D-ксилоза (IV) (рис. 1а).

Соединение I с молекулярной формулой $C_{33}H_{38}O_{23}$, определенной по данным ЯМР и масс-спектрометрии (HR-ESI-MS, m/z : эксп. 803.514 $[M+H]^+$, расч. 803.652 для $C_{33}H_{39}O_{23}$ $[M+H]^+$), содержало в масс-спектре ионы, указывающие на последовательное удаление двух фрагментов глюкозы (m/z 803→641, 479) и глюкуроновой кислоты (m/z 479→303) (рис. 1в). Форма УФ-спектра I характерна для 7,8-ди-замещенных производных гербацетина (рис. 1б) [15], а наличие уширенных однопротонных синглетов

в спектре ЯМР 1H при δ_H 9.32, 12.50 и 10.11 указывало на наличие свободных гидроксильных групп у C-3, C-5 и C-4', соответственно (табл. 2) [16]. Расположение сигналов в спектрах ЯМР было сходным с таковым гербацетина 7-O-β-D-глюкопиранозид-8-O-β-D-глюкуронопиранозид, обнаруженного в *Rhodiola ishidae* [16], кроме сигналов дополнительного фрагмента глюкозы { δ_H 4.25 (1H, д, J = 7.0), 3.90, 3.56 (1H, м); δ_C 60.4, 70.3, 74.6, 76.4, 77.2, 104.6} [17]. Сдвиг в слабое поле сигнала C-2''' фрагмента глюкуроновой кислоты (δ_C 74.0→77.6) [17] и корреляции в спектре НМВС между сигналами H-1'''' (δ_H 4.25)

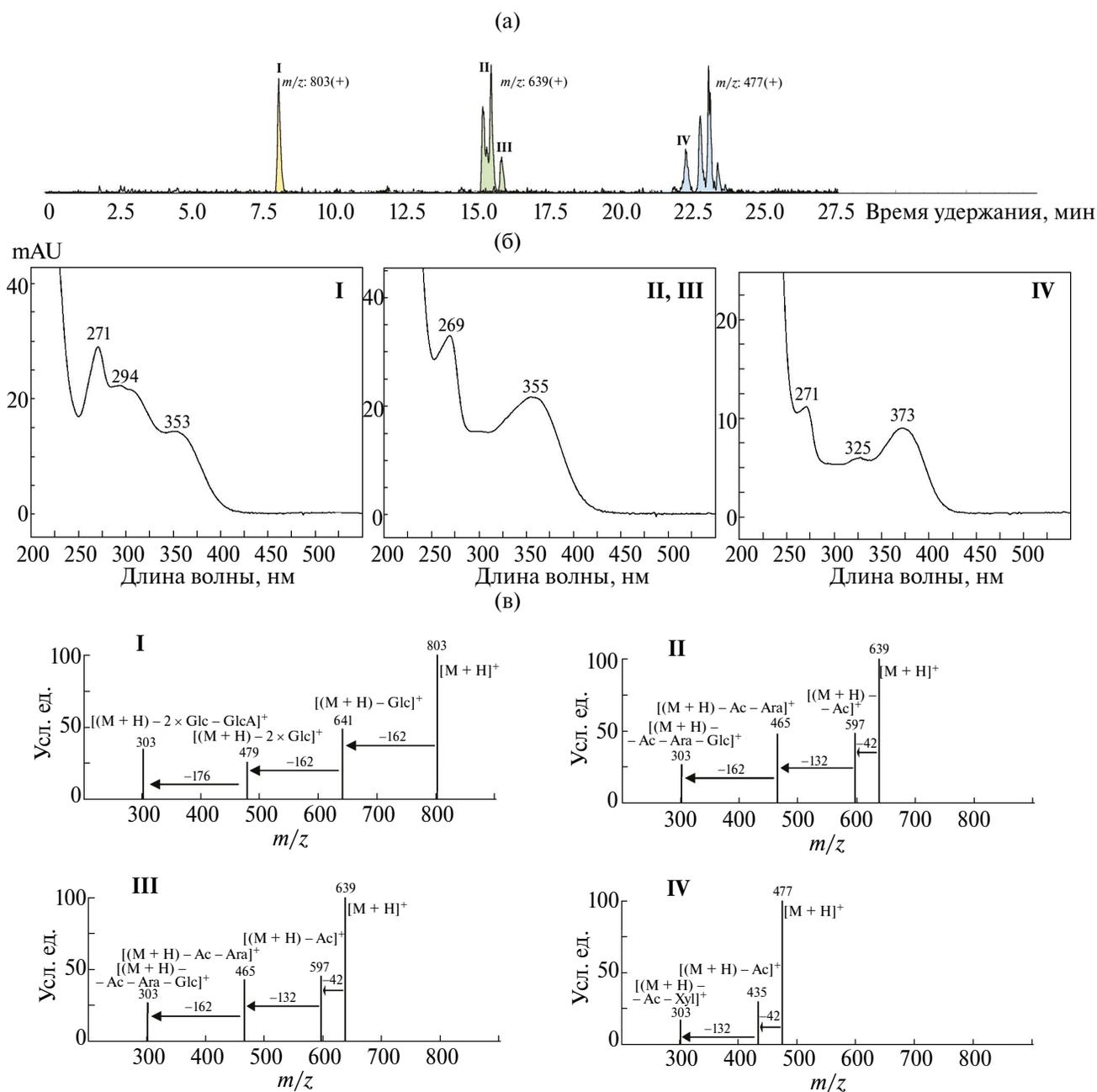


Рис. 1. Хроматограммы экстракта цветков *R. algida* в режиме выделенных ионов для m/z 803, 639 и 477 (а; расположение новых соединений отмечено цифрами I–IV), спектры поглощения соединений I–IV (б) и масс-спектры соединений I–IV (в). Ac – ацетил, Ara – арабиноза, Glc – глюкоза, GlcA – глюкуроновая кислота, Xyl – ксилоза.

и С-2''' (δ_C 77.6) указывали на присоединение второго остатка глюкозы по положению С-2''' (рис. 2). Таким образом, соединению **I** определено строение в виде гербацетин 7-*O*- β -D-глюкопиранозид-8-*O*-(2'''-*O*- β -D-глюкопиранозил)- β -D-глюкуронопиранозида (рис. 2), которому дано название родиалгин А.

Два изомерных флавоноида **II** и **III** с молекулярной формулой $C_{28}H_{30}O_{17}$ содержали в масс-спектре ион с m/z 597, указывающий на удаление ацетильного фрагмента с массой 42 а.е.м., а также с m/z 465 и 303, указывающие на элиминацию арабинозы и глюкозы, соответственно (рис. 1в). В УФ-спектре соединений отмечены экстремумы при 269 и 355 нм, характерные для 3,8-ди-замещенных производных гербацетина (рис. 1б) [15], а в спектре ЯМР 1H присутствовали четыре уширенных синглета гидроксильных групп при С-3 (δ_H 9.30, 9.35), С-5 (δ_H 12.51, 12.52), С-7 (δ_H 10.85, 10.87) и С-4' (δ_H 10.12, 10.14) (табл. 2). Данные спектров ЯМР указывали на сходство **II** и **III** и гербацетин 3-*O*- β -D-глюкопиранозид-8-*O*- α -L-арабинопиранозида, выделенного из *Sedum japonicum* subsp. *oryzifolium* [18], за исключением дополнительных сигналов ацетильной группы (δ_H 2.00, 2.04; δ_C 20.2, 20.4, 168.9, 170.2) [19]. Ацильный заместитель располагался у атомов С-2''' для **II** и С-4''' для **III**, на что указывали сдвиги в слабое поле сигналов С-2''' и С-4''', соответственно, а также взаимные корреляции между сигналами углерода карбонильной группы и протонами Н-2''' (**II**) и Н-4''' (**III**) (рис. 2). Соединения **II** и **III** представ-

ляли собой гербацетин 3-*O*- β -D-глюкопиранозид-8-*O*-(2'''-*O*-ацетил)- α -L-арабинопиранозид (родиалгин В) и гербацетин 3-*O*- β -D-глюкопиранозид-8-*O*-(4'''-*O*-ацетил)- α -L-арабинопиранозид (родиалгин С), соответственно (рис. 2).

Соединение **IV** с молекулярной формулой $C_{22}H_{20}O_{12}$ содержало в масс-спектре ионы, указывающие на последовательное удаление ацетильной группы (m/z 477→435) и ксилозы (m/z 435→303) (рис. 1в). Данные УФ и ЯМР были близки к таковым родалина (гербацетин 8-*O*- β -D-ксилопиранозида) [11], но в спектрах ЯМР присутствовали добавочные сигналы ацетильной группы. Сигнал углерода С-4'' был сдвинут в слабое поле (δ_C 69.3→71.8) относительно такого родалина, а также выявлены корреляции в спектре НМВС между сигналами Н-4'' и углеродом карбонильной группы (δ_H/δ_C 4.52/170.1), что позволило сделать выводы о строении соединения в виде гербацетин 8-*O*-(4''-*O*-ацетил)- β -D-ксилопиранозид (родиалгин D), изомером которого является ацетилродалин (гербацетин 8-*O*-(3''-*O*-ацетил)-ксилозид), обнаруженный в корнях *R. algida* [6].

Дополнительные сведения о фенольных соединениях цветков *R. algida* были получены после анализа экстрактов растения с применением метода ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС (рис. 3), который позволил выявить 96 веществ, среди которых таннины, антоцианы и флавонолы (табл. S1). Производные госсипетина, гербацетина, гибисцетина, кемпферола и кверцетина содержали в масс-спектрах сигнал иона агликона с m/z

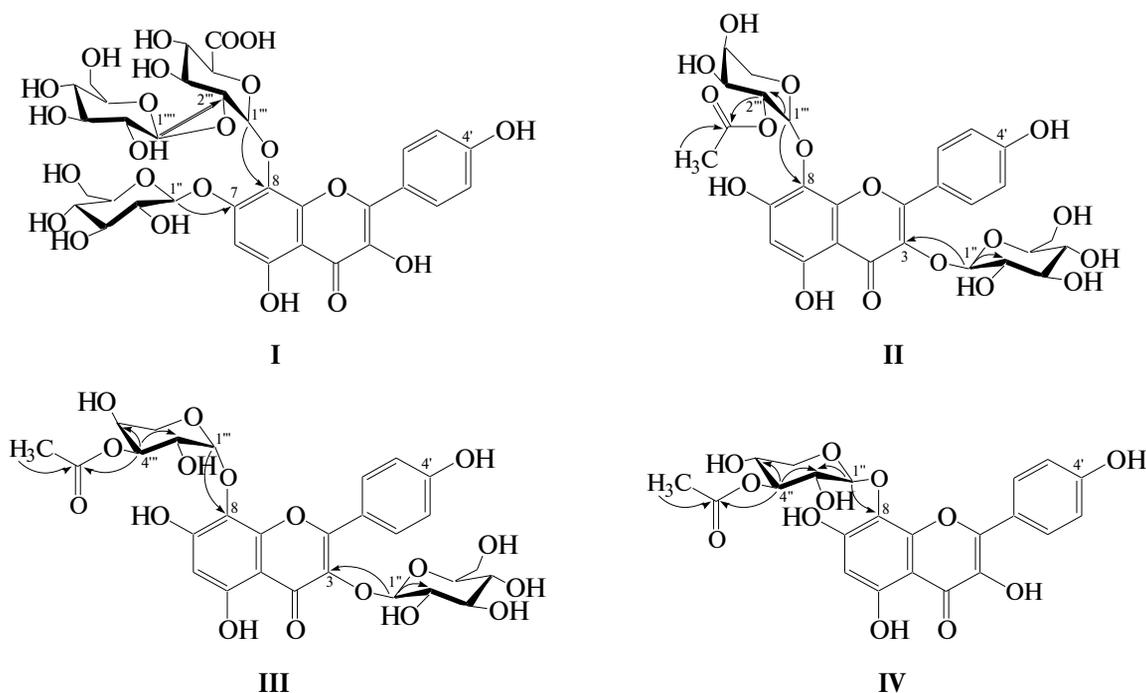


Рис. 2. Строение новых гликозидов гербацетина I–IV. Стрелками указаны ключевые корреляции в спектрах НМВС.

Таблица 2. Сигналы спектров ЯМР ¹H (500 МГц) и ¹³C (125 МГц) соединений I–IV (ДМСО-d₆, 330 К, δ_H/δ_C, м.д., J/Гц).

C-атом	I		II		III		IV	
	d _H	d _C						
2		147.5		155.8		155.5		147.0
3		135.2		133.0		133.3		133.5
4		175.1		177.3		177.0		176.8
5		157.0		156.7		156.3		156.6
6	6.10 (1H, c)	99.3	6.25 (1H, c)	99.8	6.27 (1H, c)	99.7	6.26 (1H, c)	99.5
7		156.5		157.0		157.2		156.1
8		126.4		125.1		125.3		125.4
9		147.8		147.6		147.4		147.8
10		105.0		103.2		103.5		103.4
1'		121.4		121.2		121.4		121.2
2',6'	8.21 (2H, д, J = 9.0)	130.1	8.22 (2H, д, J = 9.0)	130.2	8.20 (2H, д, J = 9.1)	130.4	8.25 (2H, д, J = 9.0)	130.3
3',5'	6.82 (2H, д, J = 9.0)	115.0	6.81 (2H, д, J = 9.0)	115.4	6.78 (2H, д, J = 9.1)	115.2	6.85 (2H, д, J = 9.0)	115.1
4'		159.5		160.1		160.3		160.1
3-ОН	9.32 (1H, c)		9.30 (1H, c)		9.35 (1H, c)		9.33 (1H, c)	
5-ОН	12.50 (1H, c)		12.52 (1H, c)		12.51 (1H, c)		12.50 (1H, c)	
7-ОН	–		10.87 (1H, c)		10.85 (1H, c)		10.82 (1H, c)	
4'-ОН	10.11 (1H, c)		10.14 (1H, c)		10.12 (1H, c)		10.10 (1H, c)	
	7-O-β-D-Glcp		3-O-β-D-Glcp		3-O-β-D-Glcp		8-O-β-D-Xylp	
1''	4.33 (1H, д, J = 7.0)	104.9	5.23 (1H, д, J = 7.0)	102.1	5.20 (1H, д, J = 7.1)	102.4	5.50 (1H, д, J = 6.0)	105.2
2''		74.9		74.7		74.5	3.35 (1H, м)	73.4
3''		76.9		76.7		76.9	3.25 (1H, м)	74.3
4''	2.85–3.35 (8H, м)	70.7	2.93–3.35 (4H, м)	70.5	2.97–3.36 (4H, м)	70.7	4.52 (1H, м)	71.8
5''		76.1		76.0		76.2	3.65 (1H, м, H _A), 3.19 (1H, м, H _B)	64.5
6''	3.95 (1H, м, H _A), 3.61 (1H, м, H _B)	60.1	3.98 (1H, м, H _A), 3.69 (1H, м, H _B)	60.2	4.01 (1H, м, H _A), 3.72 (1H, м, H _B)	60.4		
	8-O-β-D-GlcAp		8-O-α-L-Arap		8-O-α-L-Arap			
1'''	5.51 (1H, д, J = 7.9)	106.4	4.21 (1H, д, J = 6.3)	102.9	4.80 (1H, д, J = 6.0)	104.5		
2'''	3.65 (1H, м)	77.6	3.65 (1H, м)	73.7	3.61 (1H, м)	71.3		
3'''	3.42 (1H, м)	74.0	3.42 (1H, м)	72.0	3.45 (1H, м)	72.4		
4'''	3.51 (1H, м)	71.5	3.37 (1H, м)	69.5	3.32 (1H, м)	72.0		
5'''	3.78 (1H, м)	75.1	3.02 (1H, м, H _A), 2.90 (1H, м, H _B)	65.5	3.05 (1H, м, H _A), 2.92 (1H, м, H _B)	63.1		
6'''		170.4						
	2''-O-β-D-Glcp							
1''''	4.25 (1H, д, J = 7.0)	104.4						
2''''		74.6						
3''''		77.2						
4''''	2.85–3.35 (8H, м)	70.3						
5''''		76.4						
6''''	3.90 (1H, м, H _A), 3.56 (1H, м, H _B)	60.4						
2''-COCH ₃			2.00 (3H, c)	168.9, 20.5				
4''-COCH ₃					2.04 (3H, c)	170.2, 20.2	2.05 (3H, c)	170.1, 20.0

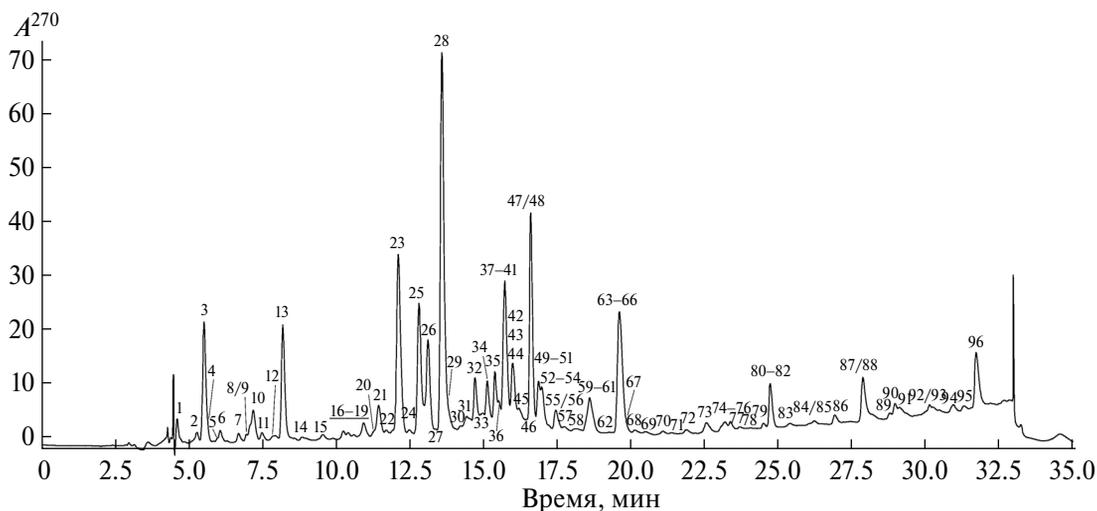


Рис. 3. Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД, λ 270 нм) экстракта цветков *R. algida*. Номера соединений указаны согласно табл. S1.

319, 303, 335, 287 и 303 соответственно. На наличие гликозидной природы метаболитов указывал размер уходящих частиц, характерный для гексозы (162 а.е.м.), гексуриновой кислоты (176 а.е.м.), пентозы (132 а.е.м.) или дезоксигексозы (146 а.е.м.), а удаление фрагмента с массой 42 а.е.м. свидетельствовало о присутствии ацетатного заместителя [8, 19].

В составе таннинов *R. algida* были обнаружены три известных моногаллоил глюкозы (1-*O*-, **1**; 6-*O*-, **2**; 4-*O*-, **10**) и галловая кислота (**3**), а антоцианы были представлены двумя гликозидами цианидина – **6** (цианидин 3,5-ди-*O*-глюкозид) и **11** (цианидин 3-ди-*O*-глюкозид).

Госсипетин (**82**), присутствующий в свободном виде, входил в состав семи известных гликозидов, включая выделенные ранее **25**, **32**, **39**, и **59**, а также родиквадрин А (**27**), госсипетин 7-*O*-глюкозид (**47**) и госсипетин 8-*O*-глюкозид (**65**), обнаруженные после сравнения хроматографических и спектральных данных с таковыми известных флавоноидов. Неизвестные соединения с протонированными ионами с m/z 981 (**4**, **5**), 819 (**7**) и 657 (**30**) представляли собой гексуриониды госсипетина (m/z 495–319), содержащие три (m/z 981–819, 657, 495), два (m/z 819–657, 495) и один (m/z 657–495) фрагмент гексозы, соответственно. Соединение **45** демонстрировало последовательную потерю двух фрагментов ацетата (m/z 697–655, 613), пентозы (m/z 613–481) и гексозы (m/z 481–319). К настоящему времени неизвестны природные аналоги **4**, **5**, **7** и **45**, в то время как **30** является изомером флавоноидов **25** и **27**.

Наибольшее количество обнаруженных флавонолов (**63**) принадлежало группе гербацетина, который был также выявлен в форме агликона (**88**). Кроме выделенных соединений **13**, **26**, **28**,

34, **35**, **38**, **44**, **48**, **63**, **68** и **73** были идентифицированы гербацетин 3-*O*-глюкозид (**40**), гербацетин 3-*O*-глюкуронид (**48**), мелокорин (**63**), родиозин F (**75**) и обнаруженный в корнях *R. algida* родалгин (**68**) [5]. Неацилированные гликозиды представляли собой гексуриониды гербацетина (m/z 479–303) с тремя (**8**, **9**), двумя (**12**, **14**, **15**) и одним (**33**) фрагментом гексозы, а также гербацетин *O*-пентозил-гексозид (**29**), *O*-дипентозид (**37**) и *O*-гексозиды (**40**, **43**). Для флавоноидов **8**, **9** и **37** аналоги в природе неизвестны. Гликозиды **12**, **14** и **15** изомерны родиалгину А (**13**) и могут представлять собой гербацетин 7-*O*-глюкозид-8-*O*-глюкурониды с дополнительным фрагментом глюкозы по положениям C-3'' и C-4''.

Среди 37 ацилированных гликозидов обнаружены моно- (**16–19**; m/z 845 [M+H]⁺) и ди-ацетаты (**20–22**, **24**; m/z 887 [M+H]⁺) гербацетин *O*-дигексозил-гексурионид, неизвестные в природе, четыре *O*-моноацетил-гексуриониды гербацетина **57**, **66**, **69** и **71** (m/z 521 [M + H]⁺), а также три ацетата гербацетин *O*-гексозил-гексуриониды (**41**, **42**, **51**; m/z 683 [M + H]⁺), изомерных известному гербацетин 3-*O*-(3''-*O*-глюкозил)-глюкозид-8-*O*-глюкурониду из *Rhodiola quadrifida* [20]. У некоторых гликозидов гербацетина в углеводной части выявлена пентозил-гексоза, содержащая один (**36**; m/z 639 [M + H]⁺), два (**50**, **52**, **54**, **56**, **58**, **62**; m/z 681 [M + H]⁺) и три (**67**, **70**; m/z 723 [M + H]⁺) ацетильных остатка, а также моноацетил- (**72**, **74**, **76–78**; m/z 477 [M + H]⁺), диацетил- (**79–81**, **83–85**; 519) и триацетил-пентоза (**92**, **93**; m/z 561 [M + H]⁺). Масс-спектр соединения **46** свидетельствовал об удалении ацетата (m/z 609–567) и двух фрагментов пентозы (m/z 567–435, 303), что возможно для неизвестного в природе гербацетин *O*-ацетил-дипентозид.

Из трех гликозидов гибисцетина флавонол **23** был выделен, гибисцетин 8-*O*-глюкуронид (гибифолин) (**55**) определен после сравнения со стандартным образцом, а **31** предварительно описан как гибисцетин *O*-гексуронид. Производные кемпферола включали 4'-*O*-глюкозид (**49**), 3-*O*-рамнозид (**60**) и серию дезоксигексозидов с одной (**89–91**) и двумя (**94–96**) ацетильными группами, а гликозиды кверцетина были представлены кверцетин 3-*O*-рамнозидом (**53**) и двумя диацетил-дезоксигексозидами **86** и **87**.

Компонентный состав фенольных соединений листьев *R. algida* был близок к таковому цветков, но включал 45 компонентов, среди которых отсутствовали антоцианы, гликозиды гибисцетина, а также большая часть гликозидов госсипетина и гербацетина (табл. S1). В стеблях и семенах *R. algida* удалось идентифицировать 25 и 12 соединений соответственно. Данные о количественном содержании отдельных соединений в органах *R. algida* указывали на доминирование в цветках гербацетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-глюкуронида (**28**; 25.67 мг/г), гербацетин 3-*O*-глюкуронида (**48**; 9.23 мг/г), галловой кислоты (**3**; 8.62 мг/г) и родиалгина А (4.85 мг/г); в листьях – **28** (11.83 мг/г), **3** (9.67 мг/г), **48** (3.59 мг/г) и 4-*O*-галлоил глюкозы (3.11 мг/г); в стеблях – **28** (1.52 мг/г) и **3** (1.83 мг/г); в семенах – **28** (0.57 мг/г). Таким образом, несмотря на отличия в составе и концентрации отдельных соединений, флавоноид **28** является основным фенольным метаболитом надземных органов *R. algida*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование фенольных соединений *R. algida* выявило присутствие 96 соединений, из которых для 35 определена структура после выделения и хроматографического анализа методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС, а 60 дана предварительная химическая характеристика. Среди идентифицированных соединений родалин [5] и родалин [6] ранее описаны для вида, из корней которого были выделены. В предыдущих исследованиях разными авторами в *R. rosea* были обнаружены родалидин [6], госсипетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-глюкуронид, госсипетин 8-*O*-глюкуронид, гербацетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-глюкуронид, родирозин F [19], гибисцетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-глюкуронид [21], галловая кислота и 1-*O*-галлоил глюкоза [8], в *R. crenulata* – гербацетин 3-*O*-глюкозид и кверцитрин [22], в *R. kirilowii* – гербацетин 7-*O*-глюкозид [14], родиквадрины А и С – в *R. quadrifida* [20], афцелин – в *R. litvinovii* [23], цианидин 3-*O*-глюкозид – в *R. ishidae* [16]. Гербацетин 3-*O*-глюкозид-8-*O*-(2''-*O*-ацетил)-ксилозид был выделен из близкого к роду *Rhodiola* вида *Sedum japonicum* subsp. *oryzifolium* [18]. Госсипетин 3-*O*-

7-*O*- и 8-*O*-глюкозиды, 3-*O*-глюкуронид, гербацетин 3-*O*-глюкуронид, гибифолин, кемпферол 4'-*O*-глюкозид, цианидин 3,5-ди-*O*-глюкозид, 4-*O*- и 6-*O*-галлоил глюкозы обнаружены впервые для рода *Rhodiola*.

Из 90 обнаруженных флавонолов 79 относились к 8-гидрокси-флавонолам, причем 63 из них (70% от общего числа) были производными гербацетина, который является самым распространенным флавоноидным агликоном рода *Rhodiola*, особенно для его подсекции *Eurhodiola*, в которую входят *R. rosea*, *R. sachalinensis*, *R. linearifolia* и другие [1]. Наибольшее число гликозидов 8-гидрокси-флавонолов содержало заместители по положениям С-8 (9 соединений) и С-3,8 (7 соединений), что также характерно для флавоноидов *Rhodiola* [2] и считается химической особенностью рода [16]. Менее распространенными в надземной части *R. algida* оказались 3-*O*-, 7-*O*- и 7,8-ди-*O*-замещенные флавоноиды, характерные для видов *Sedum* и *Hylotelephium* [18].

Изучение распределения фенольных соединений в надземных органах *R. algida* показало, что цветки являются морфологической группой с наибольшей способностью к накоплению флавоноидов. Ранее подобное явление также было отмечено для цветков *R. rosea* [8, 15]. Ввиду того, что флавоноиды в растениях выполняют разные функции, можно предположить, что их накопление в цветках как генеративном органе связано с необходимостью регуляции роста клеток, привлечения насекомых-опылителей и защиты от биотического и абиотического стресса [3].

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта FWSM-2021-0005 (№121030100227-7).

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. Cunningham A.B., Li H.L., Luo P., Zhao W.J., Long X.C., Brinckmann J.A. There “ain’t no mountain high enough”?: The drivers, diversity and sustainability of China’s *Rhodiola* trade // J. Ethnopharmacol. 2020. V. 252. № 112379. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112379>
2. Tao H., Wu X., Cao J., Peng Y., Wang A., Pei J., Xiao J., Wang S., Wang Y. *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study // Med. Res. Rev. 2019. V. 2019. P. 1. <https://doi.org/10.1002/med.21564>

3. Dias M.C., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity // *Molecules*. 2021. V. 26. № 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
4. Плещёва Е.С., Бычкова О.В. Введение в культуру *in vitro* родиолы холодной (*Rhodiola algida*) // Ломоносовские чтения на Алтае, Часть 2. Барнаул: Алтайский государственный университет, 2017. 239 с.
5. Pangarova T.T., Zapesochnaya G.G. The structure of the flavonoids from *Rhodiola algida*. II // *Chem. Nat. Comp.* 1975. V. 11. P. 744. <https://doi.org/10.1007/BF00568460>
6. Zapesochnaya G.G. The structure of the flavonoids from *Rhodiola algida*. III // *Chem. Nat. Comp.* 1978. V. 14. P. 443. <https://doi.org/10.1007/BF00565260>
7. Krasnov E.A., Demidenko L.A. New flavonol glycosides of *Rhodiola algida* // *Chem. Nat. Comp.* 1979. V. 15. P. 353. <https://doi.org/10.1007/BF00566094>
8. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Vasilieva A.G., Fedorov I.A. LC-MS profile, gastrointestinal and gut microbiota stability and antioxidant activity of *Rhodiola rosea* herb metabolites: A comparative study with subterranean organs // *Antioxidants*. 2020. V. 9. № 526. <https://doi.org/10.3390/antiox9060526>
9. Chirikova N.K., Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. Quantitative determination of flavonoid content in the aerial parts of Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 36. P. 915. <https://doi.org/10.1134/S1068162010070204>
10. Hartzfeld P.W., Forkner R., Hunter M.D., Hagerman A.E. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. P. 1785. <https://doi.org/10.1021/jf0111155>
11. Sun B., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46. P. 4267. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>
12. Constantin O.E., Istrati D.I. Extraction, quantification and characterization techniques for anthocyanin compounds in various food matrices // *Horticulturae*. 2022. V. 8. № 1084. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111084>
13. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Acylated flavonoids from *Cucumis sativus* inhibit the activity of human pancreatic lipase // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2023. V. 59. P. 530. <https://doi.org/10.1134/S0003683823040099>
14. Краснов Е.А., Саратиков А.С., Сузов Ю.П. Растения семейства Толстянковые. Томск: ТГУ, 1979. 208 с.
15. Zapesochnaya G.G., Kurkin V.A., Shchavlinskii A.N. Flavonoids of the epigeal part of *Rhodiola rosea*. II. Structures of new glycosides of herbacetin and of gossypetin // *Chem. Nat. Comp.* 1985. V. 21. P. 464. <https://doi.org/10.1007/BF00579139>
16. Iwashina T., Nakane T., Devkota H.P. Flavonoids from the leaves and stems of *Rhodiola ishidae* (*Crassulaceae*) // *Biochem. Syst. Ecol.* 2023. V. 107. № 104622. <https://doi.org/10.3390/molecules27217632>
17. Olennikov D.N., Kashchenko N.I., Chirikova N.K. New flavonoids of the genus *Scutellaria*. I. Scutellarisides I and II from *S. titovii* and *S. catharinae* // *Chem. Nat. Comp.* 2024. V. 60. P. 26. <https://doi.org/10.1007/s10600-024-04244-3>
18. Mizuno T., Uchiyama N., Tanaka S., Nakane T., Devkota H.P., Fujikawa K., Kawahara N., Iwashina T. Flavonoids from *Sedum japonicum* subsp. *oryzifolium* (*Crassulaceae*) // *Molecules*. 2022. V. 27. № 7632. <https://doi.org/10.3390/molecules27217632>
19. Olennikov D.N., Chirikova N.K. New metabolites of *Rhodiola rosea*. I. Glycosides of herbacetin and gossypetin // *Chem. Nat. Comp.* 2022. V. 58. P. 1014. <https://doi.org/10.1007/s10600-022-03857-w>
20. Olennikov D.N., Chirikova N.K. New flavonol glycosides from *Rhodiola quadrifida* // *Chem. Nat. Comp.* 2020. V. 56. P. 1048. <https://doi.org/10.1007/s10600-020-03224-7>
21. Olennikov D.N. New metabolites of *Rhodiola rosea*. II. Hibiscetin glycosides // *Chem. Nat. Comp.* 2023. V. 59. P. 254. <https://doi.org/10.1007/s10600-023-03969-x>
22. Ni F.-Y., Xie X., Liu L., Wang Z.-Z., Xiao W. Flavonoids from roots and rhizomes of *Rhodiola crenulata* // *Chin. Tradit. Herbal Drugs*. 2016. V. 47. P. 214.
23. Krasnov E.A. Flavonoids of *Rhodiola litvinovii* // *Chem. Nat. Comp.* 1979. V. 15. P. 756. <https://doi.org/10.1007/BF00565586>

УДК 581.1:66.061.34:630.866.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА В *Reynoutria japonica* Houtt. МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2024 г. М. П. Разгонова^{а, *}, Е. И. Черевач^б, Н. С. Кириленко^а,
Е. Н. Демидова^а, К. С. Голохваст^с

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова”, Санкт-Петербург, Россия

^бФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Дальневосточный федеральный университет”, Передовая инженерная школа “Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем”, Владивосток, Россия

^сФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук”, Краснообск, Новосибирская область, Россия

*e-mail: m.razgonova@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023 г.

После доработки 19.12.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

Целью данной работы являлось уточнение метаболомного состава экстрактов, в частности наличие полифенольного комплекса в экстрактах лекарственного растения *Reynoutria japonica* Houtt., принадлежащего к семейству Polygonaceae. Для идентификации целевых аналитов в экстрактах использовалась тандемная масс-спектрометрия листьев и стеблей. Всего идентифицировано 31 химическое соединение, из них 18 соединений представляют полифенольный комплекс. В приложении к идентифицированным вторичным метаболитам некоторые соединения были обнаружены впервые, в частности полифенольные соединения: дигидрохалкон аспалатин, кумарин умбеллиферон, лигнан сирингарезинол, а также флавоны формонетин и гарденин Б.

Ключевые слова: *Reynoutria japonica*, Polygonaceae, ВЭЖХ–МС/МС, тандемная масс-спектрометрия, фенольные соединения

DOI: 10.31857/S0015330324040093, EDN: MNKJXI

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственное растение рейнуртия японская (*Reynoutria japonica* Houtt., *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc.) принадлежит к семейству Polygonaceae. Это многолетнее растение высотой 1–3 м, широко распространенное на Дальнем Востоке России, в Южной Корее, Японии, Китае, Северной Америке и Европе [1]. *R. japonica* представляет собой богатый источник функциональных метаболитов, ее нежный стебель используется в повседневных продуктах питания [2], а корни – в качестве красителя для риса. Кроме того, корень этого растения традиционно используется в качестве лекарственного средства при лечении воспалений, инфекций, желтухи, ожогов кожи, хронического бронхита и гиперлипидемических заболеваний [3]. Из *R. japonica* было выделено большое количество вторичных метаболитов, включая хиноны, стильбены, флавоноиды, кумарины и другие полифенольные соединения. Известно, что эти

функционально важные фитохимические вещества обладают противовоспалительной, противораковой, противовирусной и антибактериальной активностью [3, 4].

Нафтохиноны – это вторичные метаболиты, обнаруженные в растениях и обладающие множеством интересных биологических свойств. Многие из 1,4-нафтохинонов, особенно 5-гидрокси-1,4-нафтохинон (юглон) и его производные, проявляют мощную биологическую активность, включая антибактериальную, противогрибковую и противовирусную, антиагрегантное, противодиабетическое, противоопухолевое и цитотоксическое действие [4]. Известно, что 1,4-нафтохиноны природного происхождения или близкородственные химические вещества используются в качестве антибиотиков или химиотерапевтических средств. В работе Khalil с соавт. [5] сообщалось о химической структуре и активности против *Helicobacter pylori* пяти антрахинонов, двух стильбенов и производного

1,4-нафтохинона из корневой части *R. japonica*. Среди изолятов юглон, 2-метокси-6-ацетил-7-метилюглон, проявлял выраженную антибактериальную активность как природное соединение. Ингибирующая активность была самой высокой среди известных производных юглона [6].

Цель работы – одновременная оценка присутствия как фенольных соединений в экстрактах листьев и стеблей *R. japonica*, так и соединений других химических классов. Начальный метаболомный анализ показал наличие 30 биоактивных соединений, обнаруженных в представленных экстрактах *R. japonica*. Метаболомный анализ был осуществлен методом многомерной тандемной масс-спектрометрии для 6 экстрактов стеблей и листьев *R. japonica*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследований использовались шесть образцов *Reynoutria japonica* Houtt., представленных в коллекции Федерального научного центра агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки. Все образцы собраны в июне-июле 2023 г. Образцы хранились в морозильной камере при температуре -15°C не более 1 недели до начала экспериментов. Все образцы соответствовали морфологическим стандартам Фармакопеи Евразийского экономического союза [7].

Дробная мацерация. Для получения высококонцентрированных экстрактов применяли метод фракционной мацерации. Для мацерации случайным образом отбирали около 200 г отдельно листьев и отдельно стеблей *R. japonica*. Общее количество экстрагента (этилового спирта х.ч., 96%) делили на три равные части и последовательно настаивали листья и стебли растения первой, второй и третьей частями. Соотношение твердого вещества и растворителя составляло 1 : 15. Настаивание каждой части экстрагента проводили в течение 7 дней при комнатной температуре.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Для выполнения разделения многокомпонентных смесей использовался жидкостный хроматограф высокого давления Shimadzu LC-20 Prominence HPLC (Shimadzu, Япония), оборудованный UV-детектором и обращенно-фазовой колонкой Shodex ODP-40 4E (250 × 4,6, размер частиц 4 мкм). Элюировали в градиенте от воды к ацетонитрилу (А): 0–4 мин – 0% А; 4–60 мин – 25% А; 60–75 мин – 100% А; 75–120 мин – 100% А, скорость потока составляла 0,5 мл/мин. ВЭЖХ-анализ проведен при помощи UV-VIS-детектора SPD-20A (Kanda-Nishikicho 1-chrome, Shimadzu, Chiyodaku, Токуо, Япония) при длинах волн 230 нм

и 330 нм, температура 50°C . Объем загрузочной петли составлял 200 мкл.

Тандемная масс-спектрометрия. Масс-спектрометрические данные получены с помощью ионной ловушки amaZon SL (Bruker Daltonik, Германия), оснащенной источником ионизации электрораспылением в режимах отрицательных и положительных ионов. Оптимизированные параметры получены следующим образом: температура источника ионизации – 70°C , поток газа – 4 л/мин, газ-небилайзер (распылитель) – 7,3 psi, капиллярное напряжение – 4500 В, напряжение на изгибе торцевой пластины – 1500 В, фрагментатор – 280 В, энергия столкновения – 60 eV. Масс-спектрометр использовался в диапазоне сканирования m/z 100 – 1.700 для МС и МС/МС. Произведена фрагментация 4 порядка. Идентификация химических компонентов проводилась путем сравнения их индекса удерживания, масс-спектров и фрагментации МС с базой данных домашней библиотеки, созданной Группой биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем “Передовые инженерные школы” Дальневосточного федерального университета (Россия) на основе данных других спектроскопических методов, таких как ядерный магнитный резонанс, ультрафиолетовая спектроскопия и МС, а также сравнения полученных экспериментальных данных с известными научными результатами, опубликованными в открытой научной литературе, которые постоянно обновляются и пересматриваются.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уточнение состава вторичных метаболитов является чрезвычайно важной задачей в общей системе биохимического анализа. В данной работе был использован метод ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией и анализом фрагментированных ионов. Ниже представлен график, показывающий распределение плотности выхода биологически активных веществ при тандемной масс-спектрометрии анализируемых целевых аналитов экстракта *R. japonica* (рис. 1). Всего на ионных хроматограммах было обнаружено 300 пиков выделенных целевых аналитов. Для простоты идентификации составлена унифицированная таблица молекулярных масс целевых аналитов, выделенных из экстрактов отдельно листьев и отдельно стеблей *R. japonica* (табл. 1). При масс-спектрометрическом анализе было предварительно идентифицировано 18 соединений полифенольной группы и 13 соединений других химических групп. Полифенольные соединения, представленные в табл. 1, охватывают практически все классы полифенолов: флавоны, флаванолы, антоцианиновая группа, гидроксibenзойные и гидроксикоричные кислоты, халконы, кумарины, лигнаны и т.д.

Таблица 1. Унифицированная системная таблица целевых соединений, выделенных из экстрактов листьев и стеблей *Reynoutria japonica*

№	Класс соединений	Соединение	Химическая формула	Мол. м., Д	t _R	Ион-аддукт		Фрагментация			Источники
						[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	МС/МС 1 порядка	МС/МС 2 порядка	МС/МС 3 порядка	
Полифенольные соединения											
1	Флавоны	Формононетин	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.26	7.1		269.29	213.22	196.21	167.13	Huolisu Oral Liquid [10]; Chinese herbal formula
2	Флавоны	Гарденин Б	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	358.34	42.4		359.27	326.14	298.17	283.14	Jian-Pi-Yi-Shen pill [11]
3	Флавонолы	Кверцетин	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	8.0		303.15	257.15	229.08	161.19	<i>Mentha</i> [17]; <i>Ocimum</i> [18]
4	Флавонолы	Кверцитрин [Кверцетин-рамнозид]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.37	7.4	447.38		301.18	179.19;	151.18	<i>Propolis</i> [13] <i>Euphorbia hirta</i> [12]; <i>Propolis</i> [13]
5	Флавонолы	Рамнозилгексозил-метилкверцетин	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₇	612.49	49.0		613.68	595.6	521.59;	503.54; 393.47;	<i>Phoenix dactylifera</i> [19]
6	Флаваноны	Пиносембрин	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.25	42.1		257.1	210.22	185.15	173.14	<i>Propolis</i> [13]; <i>Punica granatum</i> [20]
7	Флаваноны	Аромалендрин [Дигидрокемпферол]	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.25	35.2		289.17	271.15	243.17	185.15	<i>Phoenix dactylifera</i> [19]; <i>Juglans mandshurica</i> [16]; <i>F. glaucescens</i> [21]
8	Флаваноны	Пиностромбин	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.28	40.3		271.16	229.13	201.15	173.13	<i>Propolis</i> [13]; <i>Jatropha gossypifolia</i> [22]
9	Метилированные флавоноиды	Артеметин	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388.36	39.6		389.27	356.21	341.16	312.03	Pubchem
10	Флавоноид	Полигалин А	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	476.43	42.5		477.42	458.36;	413.87;	261.21;	<i>Polygala japonica</i> [23]; <i>P. sibirica</i> [24]
								335.32;	261.32	163.17	
								155.15			
11	Антоцианины	Дельфинидин	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303.24	25.1		303.18	257.14;	229.16	201.13;	<i>A. cordifolia</i> [21]
								165.14		145.14	
12	Гидроксикоричная кислота	Кофейная кислота	C ₉ H ₈ O ₄	180.15	31.9		181.18	163.2	145.25	117.2	<i>Vaccinium myrtillus</i> [8]
13	Гидроксикоричная кислота	3,4-дигидрокси-коричная кислота	C ₉ H ₁₀ O ₄	182.17	31.5		183.1	153.23	127.15	114.33	<i>Eucalyptus Globulus</i> [25]; Chilean currants [9]
14	Гидроксibenзойная кислота	Эллаговая кислота	C ₁₄ H ₆ O ₈	302.19	8.0		303.15	257.15	229.08	161.19	<i>Euphorbia hirta</i> [12]; <i>Punica granatum</i> [20]
15	Гидроксикоричная кислота	Хлорогеновая кислота	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	19.7		355.11	163.13	145.16	117.13	<i>Vaccinium myrtillus</i> [8]; <i>Ribes magellanicum</i> [9]
16	Дигидрохалкон	Аспалатин	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	452.41	25.1		453.48	435.44;	336.34;	209.28	<i>Ribes toringoides</i> [26]; <i>Aspalathus linearis</i> [27]
								336.35;	226.30		
								227.28			
17	Кумарины	Умбеллиферон	C ₉ H ₆ O ₃	162.14	8.8		163.17	145.15	117.11		<i>F. glaucescens</i> [21]; Actinidia [28]; <i>Zostera marina</i> [29]

Таблица 1. Окончание

№	Класс соединений	Соединение	Химическая формула	Мол. м., Д	t _R	Ион-аллукт		Фрагментация			Источники
						[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	МС/МС 1 порядка	МС/МС 2 порядка	МС/МС 3 порядка	
18	Лигнан	Сирингарезинол	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	418.44	8.4		419.25	326.08; 401.24; 165.11	298.11	252.10; 154.21	Magnolia [30]; Lignans [31]
Соединения других химических групп											
19	Аминокислоты	L-Глутаминовая кислота	C ₅ H ₇ NO ₄	145.11	7.6		146.1	127.19			Soybean leaves [32]; Lonicera japonica [33]
20	Аминокислоты	Теанин	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	174.19	10.9		175.13	157.07			Camellia kucha [34]
21	Хромоны	Альгехромон А	C ₁₁ H ₁₀ O ₃	190.19	7.8		191.12	150.05			Chinese herbal formula Jian-Pi-Yi-Shen pill [11]
22	Омега-5 жирная кислота	Миристолеиновая кислота	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226.36	9.3		227.23	209.25	139.21	110.26	F. glaucescens [21]; Maackia amurensis [35]
23	Антрахинон	1,4,8-Тригидрокси-антрахинон	C ₁₄ H ₈ O ₅	256.21	41.2		257.1	210.18	181.93	181.14	Juglans mandshurica [16]
24	Антрахинон	Emodin [6-Methyl-1,3,8-trihydroxy-anthraquinone]	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	40.3		271.16	229.13	201.15	173.13	Chinese herbal formula Jian-Pi-Yi-Shen pill [11]; R. japonica (Polygonum cuspidatum) [14]; Reynoutria [15]
25	Омега-3 жирная кислота	Линоленовая кислота	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.42	37.8		279.25	219.16	159.09	178.67	Jatropha [22]; Soybean leaves [32]; Soybean [36]
26	Ненасыщенная жирная кислота	Оксо-эйкозатетраеновая кислота	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318.45	39.5		319.4	300.39; 119.30	282.35	264.25	F. poisii [21]
27	Полисахариды	Фруктозо-1,6-бисфосфат	C ₆ H ₁₀ O ₁₂ P ₂	336.08	10.9		337.07	277.06	233.99		Soybean leaves [32]; Soybean [36]
28	Тритерпеноиды	Уваол	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.72	36.0		443.7	425.36; 175.27	367.33; 174.72	117.2	F. herreriae [21]
29	Сесквитерпеновый алкалоид	Сеспендол	C ₃₃ H ₄₅ NO ₄	519.71	45.6		520.47	184.15; 502.48	125.13		Hyloseurus polyrhizus [37]
30	Иридоиды	л-Кумарил монотропеин гексозид	C ₃₇ H ₆₂ O ₁₂	698.88	38.6		699.54	537.45; 347.20;	375.30; 259.10		Vaccinium myrtillus [38]
31	Продукт деградации хлорофилла	Феофитин А	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	871.2	48.6		872.1	203.16 593.46	533.41	461.36	Physalis peruviana [39]

Примечание. t_R – время удерживания, t (мин).

На рис. 1 и 2 представлены распределение плотности выхода биологически активных веществ при тандемной масс-спектрометрии анализируемых целевых аналитов экстракта и распределенный график тандемной масс-спектрометрии анализируемых целевых аналитов экстракта *R. japonica*, представленный ионной хроматограммой. Впервые в экстрактах *R. japonica* обнаружены следующие полифенольные соединения: дигидрохалкон аспалатин, кумарин умбеллиферон, лигнан сиригарезинол, а также флавоны формонетин и гарденин Б.

На рис. 2–5 представлены масс-спектры, полученные методом тандемной масс-спектрометрии, и расшифровка выделенных химических соединений из экстрактов *R. japonica*. Масс-спектр хлорогеновой кислоты из экстракта листьев *R. japonica* представлен на рис. 2. $[M + H]^+$ ион-аддукт продуцирует один фрагментарный

ион с m/z 163.13 (рис. 2). В свою очередь фрагментарный ион с m/z 163.13 продуцирует дочерний ион с m/z 145.16, который далее фрагментирует ион с m/z 117.13. Данное соединение идентифицировано, согласно полученной фрагментации, как хлорогеновая кислота, что подтверждается подобными фрагментациями указанного химического соединения в следующих растительных матрицах: *Vaccinium myrtillus* [8] и *Ribes magellanicum* [9].

Путь фрагментации молекулы хлорогеновой кислоты, выраженный в структурных формулах, представлен ниже на рис. 3. Данный путь фрагментации, представленный в структурных формулах, практически полностью совпадает с масс-спектром хлорогеновой кислоты, представленным на рис. 2. Масс-спектр флавоноа формонетина из экстракта стеблей *R. japonica* представлен на рис. 4. $[M + H]^+$ ион продуцирует один фрагментарный ион при m/z 213.22 (рис. 4).

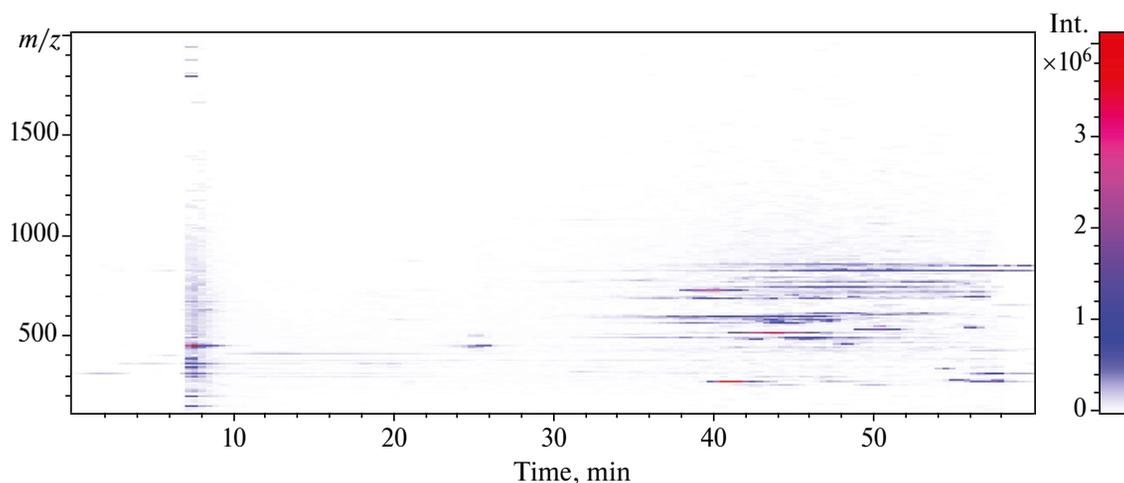


Рис. 1. Распределение плотности выхода биологически активных веществ при тандемной масс-спектрометрии анализируемых целевых аналитов экстракта *Reynoutria japonica*.

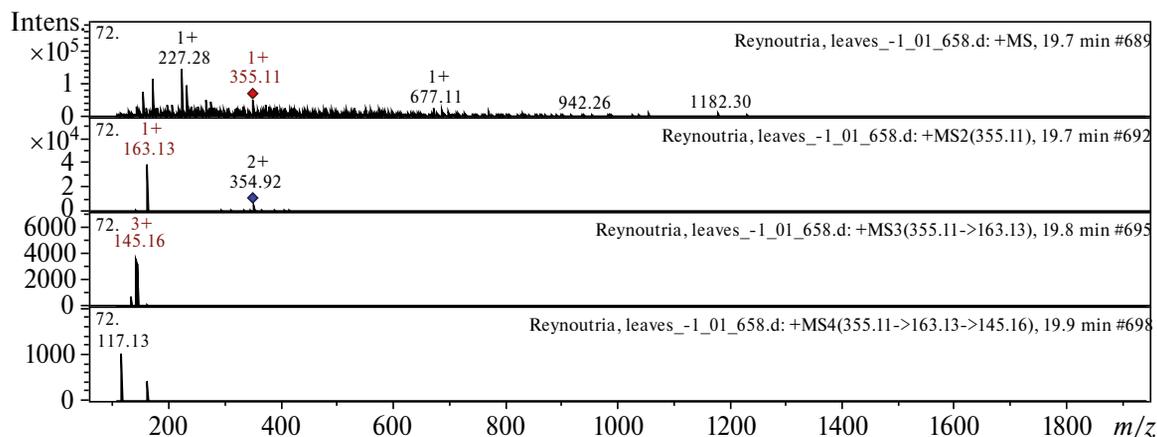


Рис. 2. Масс-спектр хлорогеновой кислоты из экстракта листьев *Reynoutria japonica*. Вверху MS-скан в диапазоне 100–1700 m/z , внизу спектры фрагментации (сверху-вниз): MS2 протонированного иона хлорогеновой кислоты (355.11 m/z , красный ромб), MS3 фрагмента 355.11→163.13 m/z и MS4 фрагмента 355.19→163.13→145.16 m/z .

Фрагментарный ион при m/z 213.22 порождает один дочерний ион при m/z 196.21. Фрагментарный ион при m/z 196.21 продуцирует один дочерний ион при m/z 167.13. Это соединение идентифицировано по подобным фрагментациям

в Huolisu Oral Liquid [10], Chinese herbal formula Jian-Pi-Yi-Shen pill [11].

Масс-спектр флавонола кверцитрина из экстракта листьев *R. japonica* представлен на рис. 5. $[M - H]^-$ ион продуцирует один фрагмен-

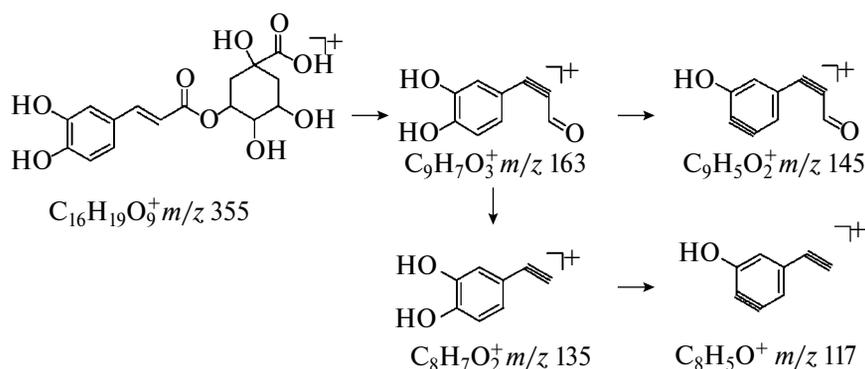


Рис. 3. Путь фрагментации молекулы хлорогеновой кислоты.

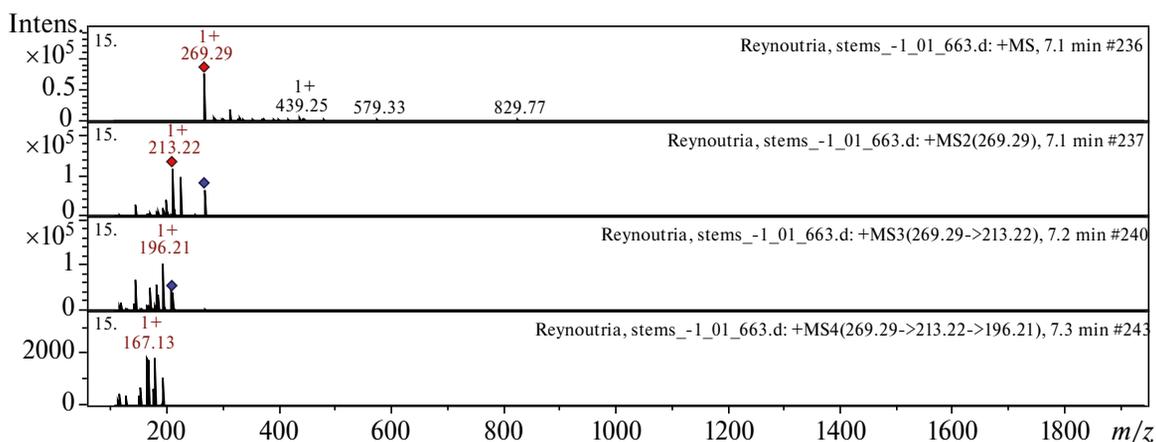


Рис. 4. Масс-спектр формононетина из экстракта стеблей *Reynoutria japonica*. Вверху MS-скан в диапазоне 100–1700 m/z , внизу спектры фрагментации (сверху-вниз): MS2 протонированного иона формононетина (269.29 m/z , красный ромб), MS3 фрагмента 269.29→213.22 m/z и MS4 фрагмента 269.29→213.22→196.21 m/z .

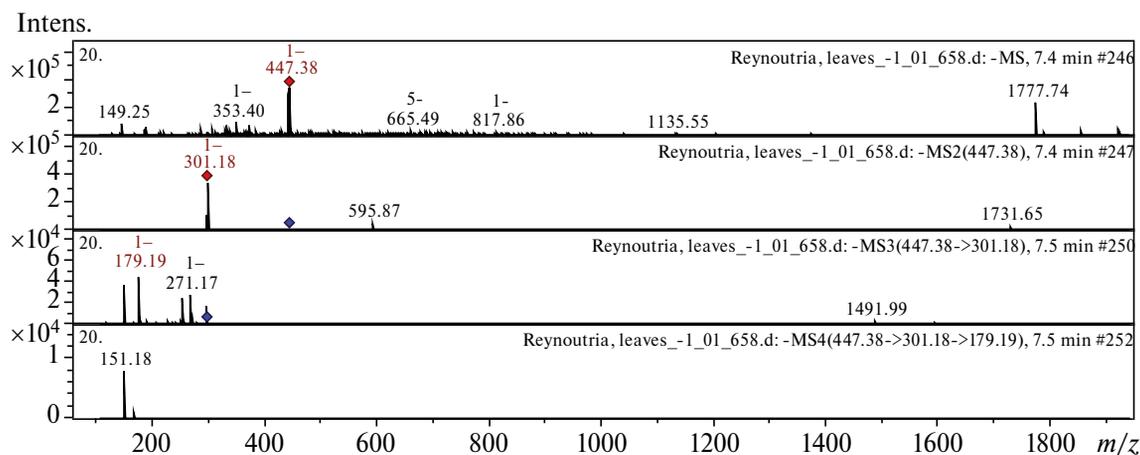


Рис. 5. Масс-спектр кверцитрина из экстракта листьев *Reynoutria japonica*. Вверху MS-скан в диапазоне 100–1700 m/z , внизу спектры фрагментации (сверху-вниз): MS2 протонированного иона кверцитрина (447.38 m/z , красный ромб), MS3 фрагмента 447.38→301.18 m/z и MS4 фрагмента 447.38→301.18→179.19 m/z .

тарный ион при m/z 301.18 (рис. 5). Фрагментарный ион при m/z 301.18 порождает два дочерних иона при m/z 271.17 и m/z 179.19. В фрагментации четвертого порядка присутствует один дочерний ион с m/z 151.18. Это соединение предположительно идентифицировано как кверцитрин по похожей фрагментации данного химического соединения в *Euphorbia hirta* [12], *Propolis* [13].

На рис. 6 представлена диаграмма Венна, которая обобщает масс-спектрометрические исследования, представленные выше в табл. 1, и наглядно показывает совпадения и расхождения в обнаруженных химических соединениях отдельно в листьях и стеблях *R. japonica*. На диаграмме Венна (рис. 6) показано, что присутствует большая степень схожести по химическим соединениям в листьях и стеблях *R. japonica*. Данные диаграммы Венна расшифрованы в табл. 2, представляющей присутствие тех или иных химических соединений в стеблях и листьях, или отдельно в стеблях и отдельно в листьях.

Из табл. 2 можно заключить, что 9 выявленных химических соединений встречаются как

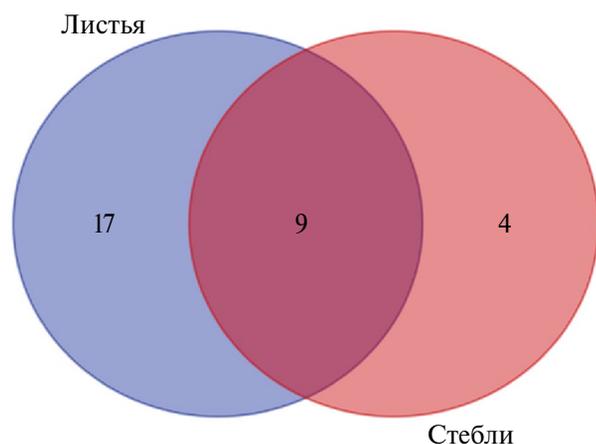


Рис. 6. Диаграмма Венна предварительно идентифицированных химических соединений *Reynoutria japonica*.

в экстрактах листьев, так и в экстрактах стеблей растений *R. japonica*. Это химические соединения: аспалатин, 3,4-дигидрокси-гидрокоричная кислота, феофитин А, миристоленовая кислота, сеспендол, линоленовая кислота, кверцитрин, фруктоза-1,6-бисфосфат, L-теанин. 17 химических соединений, в основном это полифенольные соединения, встречаются только в экстрактах листьев растений и 4 химических соединения встречаются только в экстрактах стеблей растений. Предварительный масс-спектрометрический анализ показал, что листья *R. japonica* гораздо богаче по полифенольному составу, нежели стебли растения.

Антрахиноны эмодин, эмодин-8-О-глюкозид, а также эмодин-8-О-(6'-О-малонил)-глюкозид ранее были обнаружены и идентифицированы у изученных видов *R. japonica*, *R. sachalinensis*, *R. bohemica* с помощью масс-спектрометрического анализа [14, 15]. В данных соединениях наиболее распространены ионы-продукты при m/z 269 [M – H-162] (из-за потери глюкозильного фрагмента), что характерно для эмодина. Соединение 1,4,8-тригидрокси-антрахинон также было охарактеризовано впервые в данном исследовании (рис. 7). Здесь депротонированная молекула при m/z 256 [M + H]⁺ для соединения 23 показала наиболее распространенный ион-продукт при m/z 210 [M + H – 46]⁺ и ион-продукт при m/z 181 [M + H – 46 – 29]⁺, что соответствует характеру фрагментации 1,4,8-тригидрокси-антрахинона, ранее выявленного в *Juglans mandshurica* [16]. Следующим антрахиноном, идентифицированным во всех экстрактах, был эмодин (соединение 24) из-за его характерного УФ-спектра и фрагментации (наиболее распространенный ион-продукт при m/z 229 и меньшие ионы-продукты при m/z 201 и 173).

На основании литературных данных (*Chinese herbal formula Jian-Pi-Yi-Shen pill* [11], *R. japonica* (*Polygonum cuspidatum*) [14], *Reynoutria* [15]) соединение 24 было предварительно идентифицировано как эмодин, данное соединение

Таблица 2. Присутствие химических соединений в листьях и стеблях *Reynoutria japonica*

Исследуемые объекты	Химические соединения
Листья Стебли	Аспалатин; 3,4-дигидрокси-гидрокоричная кислота; Феофитин А; Миристоленовая кислота; Сеспендол; Линоленовая кислота; Кверцитрин; Фруктоза-1,6-бисфосфат; L-теанин;
Листья	Уваол; Кофеиновая кислота; Дигидрокемпферол; 1,4,8-тригидроксиантрахинон; Полигалин А; Сирингарезинол; Оксо-эйкозатетраеновая кислота; Кверцетин; Дельфинидин; Умбеллиферон; Рамносилгексозил-метил-кверцитин; <i>n</i> -кумарил-монотропеин гексозид; Пиносембрин; Пиностромбин; Хлорогеновая кислота; Эллаговая кислота
Стебли	Альтехромон А; Артеметин; Формононетин; Гарденин Б

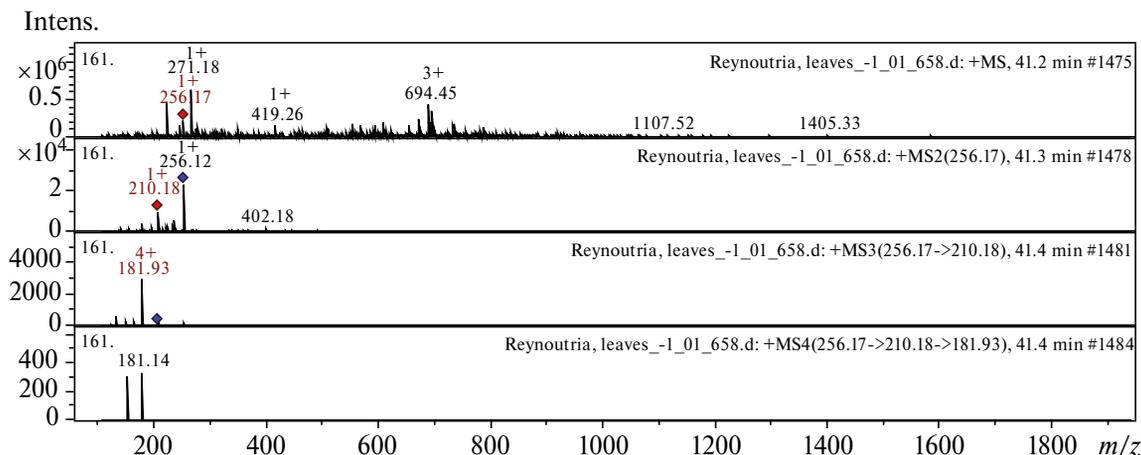


Рис. 7. Масс-спектр 1,4,8 – тригидрокси-антрахинона из экстракта листьев *Reynoutria japonica*. Вверху MS-скан в диапазоне 100–1700 m/z , внизу спектры фрагментации (сверху-вниз): MS2 протонированного иона 1,4,8 – тригидрокси-антрахинона (256.17 m/z , красный ромб), MS3 фрагмента 256.17→210.18 m/z и MS4 фрагмента 256.17→210.18→181.93 m/z .

наблюдалось во всех экстрактах *R. japonica*. Масс-спектрометрические исследования других видов рейнутрии в научной литературе показали присутствие нафтохинона эмодина также в *R. sachalinensis* и *R. bohemica* [15].

Таким образом, экстракты из листьев и стеблей растения *R. japonica* содержат большое количество полифенольных соединений, а также и другие биологически активные вещества. В данной работе авторы впервые попытались сделать метаболомное исследование образцов растения *R. japonica*, полученной из дальневосточных образцов зон произрастания данного растения. В данном исследовании для идентификации целевых аналитов использовался метод тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ в соединении с ионной ловушкой).

Результаты исследований показали присутствие 18 соединений полифенольного класса, соответствующих семейству Polygonaceae. В дополнение к обнаруженным целевым соединениям некоторые соединения были обнаружены и предварительно идентифицированы впервые в данных сортообразцах *R. japonica*. Впервые в экстрактах *R. japonica* идентифицированы следующие полифенольные соединения: дигидрохалкон аспалатин, кумарин умбеллиферон, лигнан сирингарезинол, а также флавоны формонетин и гарденин Б. Полученные данные могут поддержать будущие исследования по производству различных фармацевтических и диетических добавок, содержащих экстракты растения *R. japonica*. Широкий спектр биологически активных соединений обеспечивает большие возможности для создания новых лекарственных и биологически активных добавок на основе экстрактов из семейства *Polygonaceae*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках достижения результатов федерального проекта “Передовые инженерные школы” (Соглашение № 075-15-2022-1143 от 07.07.2022).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Cork H. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents // Food Chem. 2008. V. 109. P. 530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.064>
2. Kirino A., Takasuka Y., Nishi A., Kawabe S., Yamashita H., Kimoto M., Ito H., Tsuji H. Analysis and functionality of major polyphenolic components of *Polygonum cuspidatum* // J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2012. V. 58. P. 278.
3. Peng W., Qin R., Li X., Zhou H. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: a review // J. Ethnopharmacol. 2013. V. 148. P. 729. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.007>
4. Jin M., Sun J., Li R., Diao S., Zhang C., Cui J., Son J.K., Zhou W., Li G. Two new quinones from the roots of *Juglans mandshurica* // Arch. Pharm. Res. 2016. V. 39. P. 1237. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0781-1>
5. Khalil A.A.K., Park W.S., Kim H.J., Akter K.M., Ahn M.J. Anti-*Helicobacter pylori* compounds from *Polygonum cuspidatum* // Nat. Prod. Sci. 2016. V. 22. P. 220. <https://dx.doi.org/10.20307/nps.2016.22.3.220>

6. Khalil A.A.K., Park W.S., Lee J., Kim H.J., Akter K.-M., Goo Y.-M., Bae J.-Y., Chun M.-S., Kim J.-H., Ahn M.-J. A new anti-*Helicobacter pylori* juglone from *Reynoutria japonica* // Arch. Pharm. Res. 2019. V. 42. P. 505.
<https://doi.org/10.1007/s12272-019-01160-x>
7. Фармакопея Евразийского экономического союза. Утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 01 августа 2020 г., № 100.
8. Liu P., Lindstedt A., Markkinen N., Sinkkonen J., Suomela J., Yang B. Characterization of metabolite profiles of leaves of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. P. 12015.
<https://doi.org/10.1021/jf503521m>
9. Burgos-Edwards A., Jimenez-Aspee F., Theoduloz C., Schmeda-Hirschmann G. Colonic fermentation of polyphenols from Chilean currants (*Ribes* spp.) and its effect on antioxidant capacity and metabolic syndrome-associated enzymes // Food Chem. 2018. V. 30. P. 144.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.053>
10. Yin Y., Zhang K., Wei L., Chen D., Chen Q., Jiao M., Li X., Huang J., Gong Z., Kang N., Li F. The molecular mechanism of antioxidation of Huolisuo oral liquid based on serum analysis and network analysis // Front. Pharmacol. 2021. V. 12. P. 710976.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.710976>
11. Wang F., Huang S., Chen Q., Hu Z., Li Z., Zheng P., Liu X., Li S., Zhang S., Chen J. Chemical characterization and quantification of the major constituents in the Chinese herbal formula Jian-Pi-Yi-Shen pill by UPLC-Q-TOF-MS/MS and HPLC-QQQ-MS/MS // Phytochem. Anal. 2020. V. 31. P. 915.
<https://doi.org/10.1002/pca.2963>
12. Mekam P.N., Martini S., Nguetack J., Tagliacucchi D., Stefani E. Phenolic compounds profile of water and ethanol extracts of *Euphorbia hirta* L. leaves showing antioxidant and antifungal properties // S. Afr. J. Bot. 2019. V. 127. P. 319.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.001>
13. Belmehtdi O., Bouyahya A., Jeko J., Cziaky Z., Zengin G., Sotkó G., El Baaboua A., Senhaji N.S., Abriani J. Synergistic interaction between propolis extract, essential oils, and antibiotics against *Staphylococcus epidermidis* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* // Int. J. Second Metab. 2021. V. 8. P. 195.
<https://doi.org/10.21448/ijsm.947033>
14. Shan M.P., Cai, Y.-Z., Brooks J.D., Corke H. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents // Food Chem. 2008. V. 109. P. 530.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.064>
15. Nawrot-Hadzik I., Slusarczyk, S., Granica S., Hadzik J., Matkowski A. Phytochemical Diversity in Rhizomes of Three *Reynoutria* Species and their Antioxidant Activity Correlations Elucidated by LC-ESI-MS/MS Analysis // Molecules. 2019. V. 24. P. 1136.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061136>
16. Huo J.-H., Du X.-W., Sun G.-D., Dong W.-T., Wang W.-M. Identification and characterization of major constituents in *Juglans mandshurica* using ultra performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF/MS) // Chinese J. Nat. Medical. 2018. V. 16. P. 0525.
[https://doi.org/10.1016/s1875-5364\(18\)30089-X](https://doi.org/10.1016/s1875-5364(18)30089-X)
17. Xu L. L., Xu J. J., Zhong K. R., Shang Z. P., Wang F., Wang R.F., Liu B. Analysis of non-volatile chemical constituents of *Menthae haplocalycis* herba by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry // Molecules. 2017. V. 22. P. 1756.
<https://doi.org/10.3390/molecules22101756>
18. Pandey R., Kumar B. HPLC-QTOF-MS/MS-based rapid screening of phenolics and triterpenic acids in leaf extracts of *Ocimum* species and their interspecies variation // J. Liquid Chromatogr. & Related. 2016. V. 39. P. 225.1
<https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1148048>
19. Said R.B., Hamed A.I., Mahalel U.A., Al-Ayed A.S., Kowalczyk M., Moldoch J., Oleszek W., Stochmal A. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 512.
<https://doi.org/10.3390/ijms18030512>
20. Mena P., Calani L., Dall'Asta C., Galaverna G., Garcia-Viguera C., Bruni R., Crozier A., Del Rio D. Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn // Molecules. 2012. V. 17. P. 14821.
<https://doi.org/10.3390/molecules171214821>
21. Hamed A.R., El-Hawary S.S., Ibrahim R.M., Abdelmohsen U.R., El-Halawany A.M. Identification of chemopreventive components from halophytes belonging to Aizoaceae and Cactaceae through LC/MS – bioassay guided approach // J. Chrom. Sci. 2021. V. 59. P. 618.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa112>
22. Zengin G., Mahomoodally M.F., Sinan K.I., Ak G., Etienne O.K., Sharmeen J.B., Brunetti L., Leone S., Di Simone S.C., Recinella L., Chiavaroli A., Menghini L., Orlando G., Jeko J., Cziaky Z. Chemical composition and biological properties of two *Jatropha* species: different parts and different extraction methods // Antioxidants. 2021. V. 10. P. 792.
<https://doi.org/10.3390/antiox10050792>
23. Li T.-Z., Zhang W.-D., Yang G.-J., Liu W.-Y., Liu R.-H., Zhang C., Chen H.-S. New flavonol glycosides and new xanthone from *Polygala japonica* // J. Asian Nat. Prod. Res. 2006. V. 8. P. 401.
24. Song Yue-Lin, Zhou Guan-Shen, Zhou Si-Xiang, Jiang Y., Tu P.-F. Polygalins D–G, four new flavonol glycosides from the aerial parts of *Polygala sibirica* L. (Polygalaceae) // Nat. Prod. Res. 2013. V. 27. P. 1220.
25. Pan M., Lei Q., Zang N., Zhang H. A Strategy based on GC-MS/MS, UPLC-MS/MS and virtual molecular docking for analysis and prediction of bioactive com-

- pounds in *Eucalyptus Globulus* leaves // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 3875.
<https://doi.org/10.3390/ijms20163875>
26. Fan Z., Wang Y., Yang M., Cao J., Khan A., Cheng G. UHPLC-ESI-HRMS/MS analysis on phenolic compositions of different E Se tea extracts and their antioxidant and cytoprotective activities // Food Chem. 2020. V. 318: 126512.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126512>
 27. Fantoukh O.I., Wang Y.-H., Parveen M., Ali Z., Al-Hamoud G.A., Chittiboyina A.G., Joubert E., Viljoen A., Khan I.A. Chemical fingerprinting profile and targeted quantitative analysis of phenolic compounds from rooibos tea (*Aspalathus linearis*) and dietary supplements using UHPLC-PDA-MS // Separations. 2022. V. 9. P. 159.
<https://doi.org/10.3390/separations9070159>
 28. Chen Y., Cai X., Li G., He X., Yu X., Yu X., Xiao Q., Xiang Z., Wang C. Chemical constituents of radix *Actinidia chinensis* planch by UPLC-QTOF-MS // Biomed. Chromatogr. 2021. V. 35: e5103.
<https://doi.org/10.1002/bmc.5103>
 29. Razgonova M.P., Tekutyeva L.A., Podvolotskaya A.B., Stepanchikina V.D., Zakharenko A.M., Golokhvast K.S. *Zostera marina* L. Supercritical CO₂-extraction and mass spectrometric characterization of chemical constituents recovered from seagrass // Separations. 2022. V. 9. P. 182.
<https://doi.org/10.3390/separations9070182>
 30. Guo K., Tong C., Fu Q., Xu J., Shi S., Xiao Y. Identification of minor lignans, alkaloids, and phenylpropanoid glycosides in *Magnolia officinalis* by HPLC-DAD-QTOF-MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. 2019. V. 170. P. 153.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.044>
 31. Eklund P.C., Backman M. J., Kronberg L.A., Smeds A.I., Sjöholm R.E. Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2008. V. 43. P. 97.
<https://doi.org/10.1002/jms.1276>
 32. Liu Y., Li M., Xu J., Liu X., Wang S., Shi L. Physiological and metabolomics analyses of young and old leaves from wild and cultivated soybean seedlings under low-nitrogen conditions // BMC Plant Biol. 2019. V. 19. P. 389.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-2005-6>
 33. Cai Z., Wang C., Zou L., Liu X., Chen J., Tan M., Mei Y., Wei L. Comparison of multiple bioactive constituents in the flower and the caulis of *Lonicera japonica* based on UFLC-QTRAP-MS/MS combined with multivariate statistical analysis // Molecules. 2019. V. 24. P. 1936.
<https://doi.org/10.3390/molecules24101936>
 34. Qin D., Wang Q., Li H., Jiang X., Fang K., Wang Q., Li B., Pan C., Wu H. Identification of key metabolites based on non-targeted metabolomics and chemometrics analyses provides insights into bitterness in Kucha [*Camellia kucha* (Chang et Wang) Chang] // Food Res. Int. 2020. V. 138. P. 109789.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109789>
 35. Razgonova B., Cherevach E.I., Tekutyeva L.A., Fedoreev S.A., Mishchenko N.P., Tarbeeva D.V., Demidova E.N., Kirilenko N.S., Golokhvast K.S. *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.: supercritical CO₂-extraction and mass spectrometric characterization of chemical constituents // Molecules. 2023. V. 28. P. 2026.
<https://doi.org/10.3390/molecules28052026>
 36. Li M., Xu J., Wang X., Fu H., Zhao M., Wang H., Shi L. Photosynthetic characteristics and metabolic analyses of two soybean genotypes revealed adaptive strategies to low-nitrogen stress // J. Plant Physiol. 2018. V. 229. P. 132.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.009>
 37. Wu Y., Xu J., He Y., Shi M., Han X., Li W., Zhang X., Wen X. Metabolic profiling of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) during fruit development and maturation // Molecules. 2019. V. 24. P. 1114.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061114>
 38. Bujor O.-C. Extraction, identification and antioxidant activity of the phenolic secondary metabolites isolated from the leaves, stems and fruits of two shrubs of the Ericaceae family. Ph.D. Thesis. 2016.
 39. Eitzbach L., Pfeiffer A., Weber F., Schieber A. Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DADAPCI-MSn // Food Chem. 2018. V. 245. P. 508.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.120>

УДК 581.1; 581.134.5

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА, ОБОГАЩЕННОГО Zn-ФЕОФИТИНОМ, ИЗ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* L.

© 2024 г. М. С. Христина^а, *, Т. Н. Смолова^а^аИнститут фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Россия

*e-mail: khristin_@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 01.02.2024 г.

Принята к публикации 05.02.2024 г.

Целью работы было получение препарата, обогащенного цинковым производным феофитина, из срезанных листьев озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. Сначала проводили феофитинизацию хлорофилла и вымывание из листьев фенольных веществ, Mg^{2+} при pH 3.5–4.0 с добавкой ЭДТА-Na, затем инкубацию с $ZnCl_2$, листья высушивали и хранили в темноте. Экстракцию цинковых производных проводили 2-кратной обработкой этанолом. Для увеличения выхода проводили повторную металлизацию. Полученный препарат соответствовал Zn-феофитину *a* и *b* по данным спектрофлуориметрии и тонкослойной хроматографии. Обсуждаются перспективы использования препарата Zn-феофитина, обладающего антиоксидантной и антивирусной активностью.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., реметаллизация, удаленные листья, флуоресценция 77К, Zn-феофитин

DOI: 10.31857/S0015330324040105, EDN: MNJGZX

ВВЕДЕНИЕ

Хлорофиллы выполняют ключевую роль в фотосинтезе — уникальном природном механизме преобразования энергии солнечного света. Благодаря фотосинтезу в земной атмосфере присутствует кислород, создалась биосфера, обеспечивающая продуктами питания животных и человека. Препараты хлорофилла и его химические производные в последние годы находят успешное применение в качестве пищевых красителей [1], лекарственных средств лечения онкологических [2], вирусных заболеваний [3, 4]. Образование новых штаммов вирусов, проблемы получения эффективных вакцин и вакцинации ставят задачу разработки альтернативных средств на базе растительных физиологически активных веществ, в том числе на основе хлорофилла [5], для лечения и профилактики вирусных заболеваний. Антивирусную активность против COVID-19 проявляют препараты Zn-хлорофилла [6] и феофорбида А [7] пока в экспериментах на клеточных культурах, зараженных вирусом.

Для исследования антивирусной активности производных хлорофилла и возможности их внедрения в практику борьбы с вирусными эпидемиями [8], актуально усовершенствование методов их синтеза непосредственно в тканях растений. Синтез Zn-хлорофилла происходит

в водных растениях [9, 10], клетках *Chlorella*, выращенных в темноте [11], и в листьях пшеницы в условиях засухи при внесении удобрений, включающих ионы Zn [12–14]. Вопрос о возможности использования таких растений для выделения Zn-хлорофилла остается открытым. С другой стороны, в этом и не было необходимости, так как для его получения достаточно заменить ионы Mg^{2+} на Zn^{2+} в препарате хлорофилла, очищенном хроматографически [15]. Разработка технологии возможна, как мы предполагаем, без получения очищенного и дорогостоящего хлорофилла. С учетом технологии “зеленого окрашивания” пищевых продуктов основанного на взаимодействии металлов с феофитином [16–18], представляется реальным синтез Zn-феофитина в срезанных листьях растений и получение препаратов, обогащенных этим биологически активным веществом.

Целью настоящей работы является синтез аналога хлорофилла — Zn-феофитина в срезанных листьях озимой пшеницы и получение препаратов на его основе. В задачи входили: отработка стадий феофитинизации хлорофиллов в листьях, вымывание из них фенольных веществ, ионов Mg^{2+} , повторная металлизация ионами Zn^{2+} , хроматографический и спектрофлуориметрический контроль полученного продукта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали $ZnCl_2$, ЭДТА-Na (“AppliChem”, Германия), этанол, метанол, ацетон (“Химмед”, Россия), деионизированную воду, жидкий азот, пластины С18 (“Watman”, США), спектрофлуориметр Hitachi-850 (“Hitachi”, Япония), микроцентрифугу Hettich Universal 32R (“Hettich”, Германия), блендер, камеру для ТСХ.

Синтез Zn-феофитина проводили в срезанных листьях озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Московская 56, взятых с поля весной на стадии трубкования. Листья промывали водой, затем инкубировали 2 сут. при перемешивании в 10 мМ ЭДТА-Na (в контрольном варианте ЭДТА-Na не добавляли), подводили рН до 3.5–4.0. Экстракт удаляли, листья отмывали водой, сменяя несколько раз до полного исчезновения окраски в отмывке, затем листья высушивали при естественных условиях. Высушенные листья измельчали, переносили в 100 мМ Na-K фосфатный буфер (рН 5.5), содержащий 50–100 мМ $ZnCl_2$ и инкубировали 2 сут. при комнатной температуре в темноте при перемешивании, отмывали от несвязавшихся ионов Zn^{2+} в том же буфере. Экстракт фильтровали через капроновое полотно и центрифугировали при 5000 g 3–5 мин, высушивали и хранили в темноте. Экстракцию Zn-феофитина проводили в этаноле.

Повторную металлизацию (реметаллизацию) проводили инкубацией этанолового экстракта с 10 мМ $ZnCl_2$ (2 сут.) при комнатной температуре, разбавляли дистиллированной водой в 10 раз и осаждали Zn-феофитин центрифугированием при 5000 g, 5 мин. Формирование Zn-феофитина контролировали спектрофлуориметрически при 77К в этаноловом экстракте.

ТСХ проводили на пластинах силикагеля (“Analtech INC”, США) С18, 10×20 см, 250 мк элюентом ацетон/метанол/хлороформ (56/30/14 об/об/об).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показана схема синтеза Zn-феофитина в листьях пшеницы и реметаллизации в этаноловом экстракте. Из рис. 1 аП1 и бП4 видно, что интенсивность окраски (концентрация пигментов) этанолового экстракта металлизированного Zn^{2+} феофитина больше в опыте б. Центрифугирование экстрактов приводит к осаждению агрегатов и мелких фрагментов мембран тилакоидов (рис. 1 аП2 и бП5). Повторная экстракция этанолом этих осадков и осаждение агрегатов центрифугированием свидетельствует об отсутствии пигментов в осадке (рис. 1 аП3 и бП6).

Реметаллизация с Zn^{2+} этанолового экстракта в опыте с обработкой сухих листьев без (рис. 1аП3) и с добавлением ЭДТА-Na (рис. 1бП3)

демонстрирует полное превращение феофитина в Zn-феофитин (рис. 1аП2 и 1бП5). Также в этом случае повторная экстракция осадков этанолом подтверждает практически отсутствие в них Zn-феофитина (рис. 1 аП3 и бП6), что свидетельствует о полной экстракции продукта.

На рис. 2 представлены спектры низкотемпературной флуоресценции листьев пшеницы. Видно, что после высушивания и феофитинизации произошли значительные изменения в положении и интенсивности максимумов флуоресценции. В спектре 1 (рис. 2а) наблюдается интенсивная флуоресценция с максимумом 669 нм, характерная для флуоресценции феофитина *a* при 77К [19], уменьшилась интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* при 725 нм (ФС1), т.е. не завершилась феофитинизация хлорофилла ФС1. В зеленом листе пшеницы интенсивность максимума 725 нм значительно преобладает по сравнению с максимумами флуоресценции ФС2 (685 и 695 нм) [20]. Неодинаковая доступность хлорофилл-белковых комплексов ФС1 и ФС2 при внешних изменениях рН в мембранах влияет на феофитинизацию, что подтверждается спектром 1 (рис. 2а). В спектре 2 (рис. 2а) показаны изменения флуоресценции листьев после проведения металлизации. Видно возрастание интенсивности максимума феофитина *b* (655 нм) по сравнению с его низкой интенсивностью в спектре флуоресценции листа после феофитинизации (рис. 2а1). Этот факт можно объяснить заменой ионов Mg^{2+} на ионы Zn^{2+} в хлорофилле *b*, не подвергнутом феофитинизации. Резкое понижение интенсивности флуоресценции ФС1 (рис. 1а2), вероятно, происходит при обмене ионов Mg^{2+} на ионы Zn^{2+} и превращение хлорофилла *a* в феофитин *a* (рис. 2а, максимум 669 нм, спектр 2). На рисунке 2б представлен спектр низкотемпературной флуоресценции этанолового экстракта листьев пшеницы до и после повторной металлизации. В металлизированном экстракте и его спектре флуоресценции присутствовали фракции феофитина *b* (рис. 2б, кривая 1б, максимум флуоресценции 655 нм) и феофитина *a* (рис. 2б, кривая 1а, максимум флуоресценции 669 нм), согласно [19]. Оказалось, что повторная металлизация с Zn^{2+} приводит к динамическому изменению окраски, которая сразу при добавке металла изменилась на бурую. Инкубация исследуемого экстракта с Zn^{2+} приводит к исчезновению бурой окраски и приобретению полностью синей. На рис. 2б в спектре 2 повторно металлизированного экстракта наблюдался только один максимум, длина волны которого больше, чем длина волны максимума флуоресценции феофитина *b* (рис. 2б, 1б) и меньше, чем длина волны максимума флуоресценции феофитина *a* (рис. 2б, 1а).

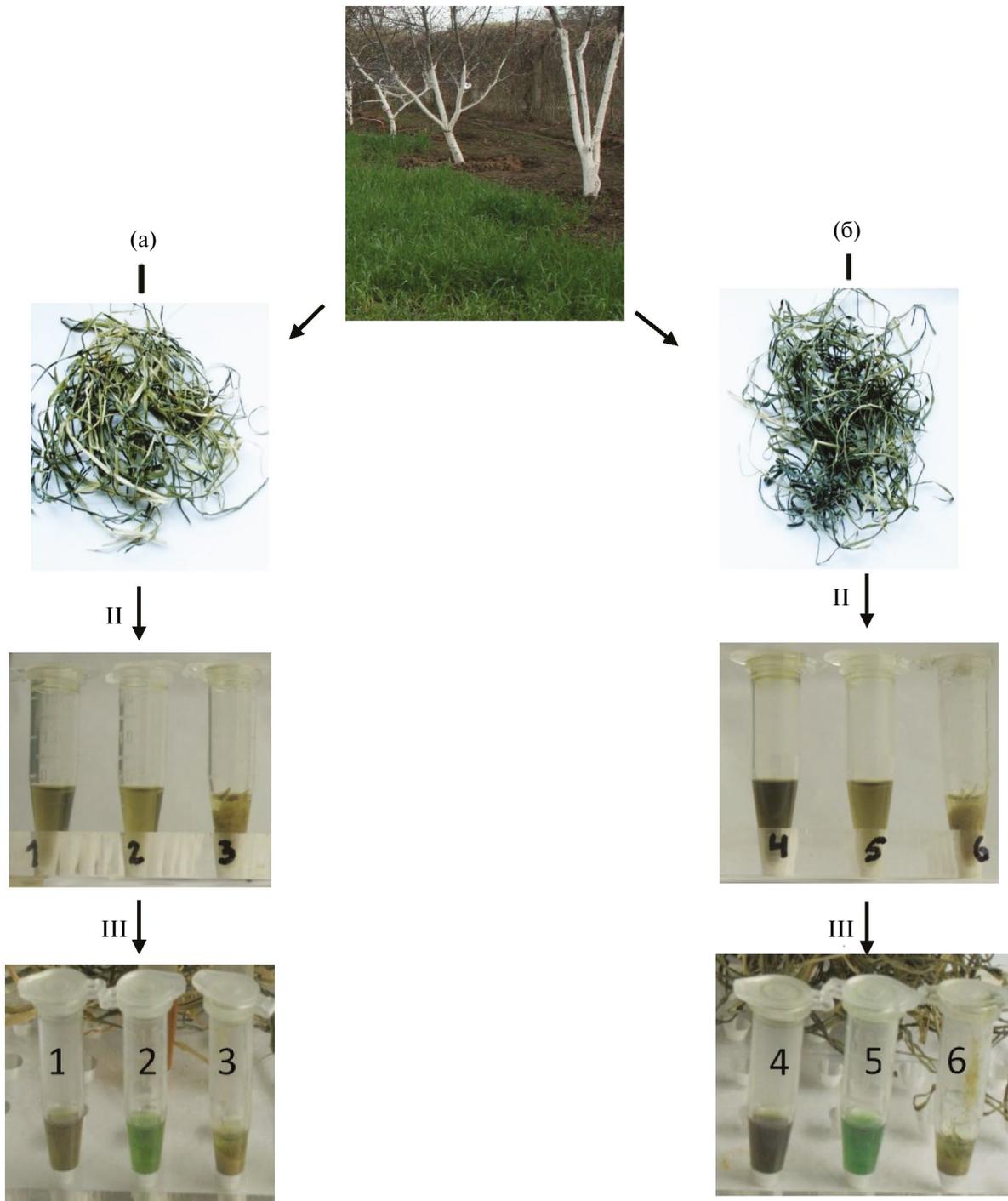


Рис. 1. Схема синтеза Zn-хлорофилла в листьях пшеницы до (I, II) и после реметаллизации с Zn^{2+} (III) без (а) и при добавлении ЭДТА–Na (б). I – Феофитинизация хлорофиллов инкубацией листьев при pH 3.5–4.0 при перемешивании до смены окраски с зеленой на бурую, отмывка дистиллированной водой до прекращения выхода окрашенных веществ и повышения pH до 5.5–6.5 в среде. II – Металлизация феофитина инкубацией листьев с 100 мМ $ZnCl_2$ при pH 5.5 до прекращения изменения окраски с буро-зеленой на сине-зеленую, отмывка дистиллированной водой, сушка, хранение в темноте, измельчение в блендере, экстракция этанолом, центрифугирование при 5000 g, 5 мин. 1, 4 – этаноловый экстракт листьев пшеницы; 2, 5 – супернатант и осадок после металлизации; 3, 6 – повторная экстракция этанолом осадка после металлизации (2, 5). III – Реметаллизация добавлением 10 мМ $ZnCl_2$ в этаноловый экстракт, инкубация 2 сут, разбавление дистиллированной водой в 10 раз и осаждение Zn-феофитина центрифугированием при 5000 g, 5 мин. 1, 4 – этаноловый экстракт после реметаллизации; 2, 5 – супернатант и осадок после реметаллизации; 3, 6 – повторная экстракция этанолом осадка после реметаллизации (2, 5).

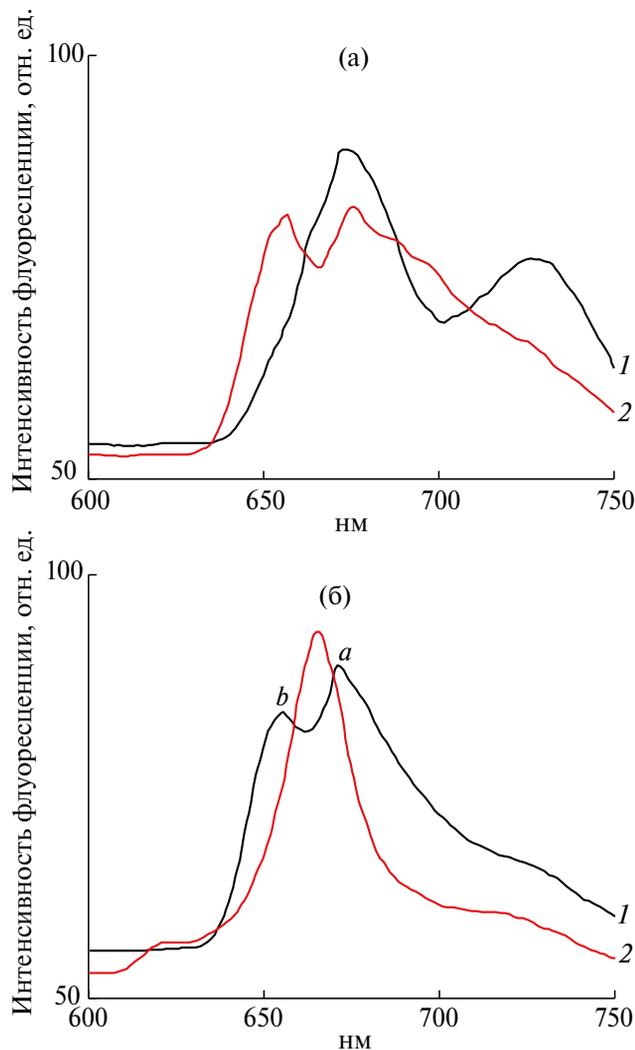


Рис. 2. Спектры флуоресценции при 77 К. (а) — листья пшеницы после феофитинизации (1) и металлизации с ионами Zn^{2+} (2); (б) — этаноловый экстракт сухих листьев пшеницы до (1) и после повторной металлизации (2). К экстракту добавляли 10 мМ $ZnCl_2$ в этаноле (1), инкубировали 2 сут. при 23°C (2); *a* — максимум флуоресценции феофитина *a*; *b* — максимум флуоресценции феофитина *b* [19].

Таким образом, в спектре флуоресценции этанолового экстракта максимум Zn-феофитина перекрывается максимумами феофитина *a* и *b*.

На рис. 3 представлены результаты ТСХ полученных препаратов. На хроматограмме 1 (экстракт сухих листьев) видно присутствие полос хлорофиллов *a* и *b*, феофитина *a*, каротина, на старте видны зоны, в которых находятся ХБК ФС1 и ФС2. Оказалось, что большая часть экстрагированного из листьев феофитина не включала ионы Zn^{2+} , вероятно, из-за неоптимальных условий металлизации, например температуры, pH, недоступности ионов Zn^{2+} (рис. 3, дорожки 2 и 3). Дополнительная металлизация экстрагированного из листьев феофитина приводила к изменению окраски первого экстракта от буро-зе-

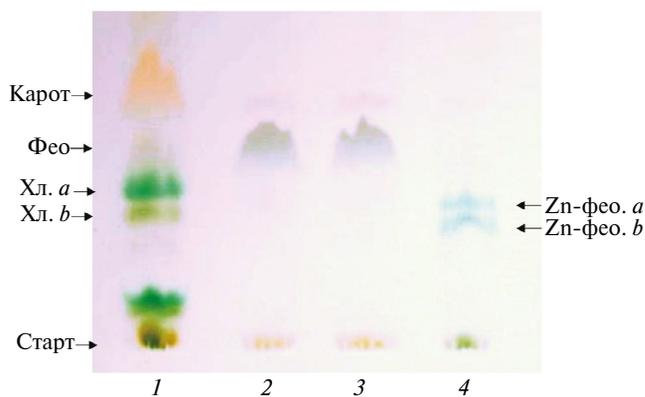


Рис. 3. ТСХ препарата Zn-феофитина (4), полученного металлизацией с $ZnCl_2$. Феофитин был получен обработкой сухих листьев пшеницы (1) при pH 3.5–4.0. 1 — экстракт сухих листьев; 2, 3 — экстракт листьев после феофитинизации; 4 — экстракт листьев после замещения Mg^{2+} на Zn^{2+} и повторной металлизации с Zn^{2+} (рис. 1, III 5).

леной к синей и образованию Zn-феофитина (рис. 3, дорожка 4), имеющего в красной области спектра флуоресценции один максимум (рис. 2б, спектр 2).

Чередование процедуры высушивания, феофитинизации, отмывания низкомолекулярных компонентов из листьев перед металлизацией способствует созданию благоприятных условий для интеграции ионов металла в молекулу феофитина. В работе [16] подчеркивается важная роль природы органического растворителя при моделировании конформации феофитина для оптимального вхождения в макроцикл хлорофилла атомов тяжелых металлов. Мы изучали влияние растворителей (вода и этанол) на металлизацию феофитина. Для этого использовали пластины для ТСХ после разделения ацетонового экстракта из листьев и длительного хранения ее в темноте. Зоны хлорофиллов *a* и *b* превращались в феофитины [17] и их возможно было металлизировать. На рис. 4, *a1* и *a2* представлены результаты синтеза Zn-феофитина на пластине для ТСХ после разделения хлорофиллов и хранения пластины длительное время. Интенсивность окрашенной зоны (рис. 4 *a1*) в результате длительного хранения снизилась на 80% (рис. 4 *a2*). На участок феофитинизированного хлорофилла наносили 10 мкл спиртового раствора 1 М $ZnCl_2$, затем подогрели в потоке горячего воздуха и через 2–3 мин наблюдали изменение серо-бурой окраски на синюю (рис. 4 *a2*). Нанесение 10 мкл 1 М водного раствора $ZnCl_2$ (рис. 4 *b2*) на поверхность зоны, содержащей феофитин не изменяло окраски, даже при длительной инкубации в течение 2 сут. Причинами отсутствия включения Zn^{2+} в зоне *b2* в водном растворе может быть неподходящая конформация феофитина.

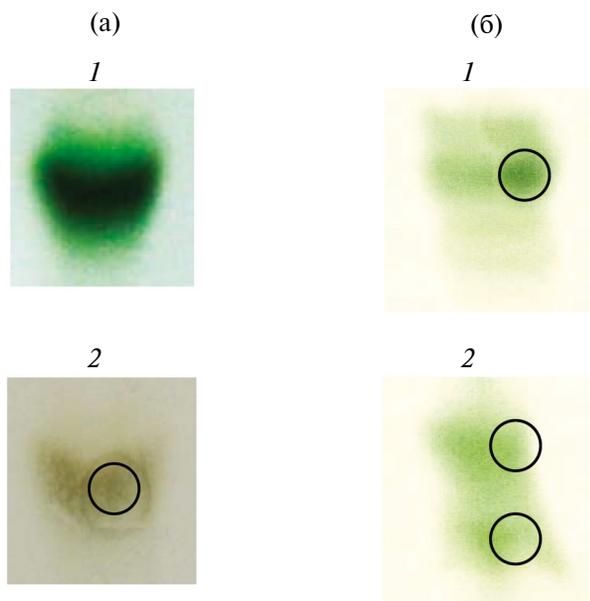


Рис. 4. Включение ионов Zn^{2+} в феофитин на пластине силикагеля для ТСХ. (а) 1 – зона Хл $a + b$, сразу после ТСХ, 2 – та же зона Хл $a + b$ после длительного хранения аэробно при комнатной температуре в темноте. На поверхность зоны (обозначена кружком) нанесено 10 мкл 1 М $ZnCl_2$ [17] в спирте. Видно изменение окраски, свидетельствующее о включении Zn^{2+} в феофитин. (б) – зона феофитина на пластине ТСХ после хроматографии этанолового экстракта листьев пшеницы, инкубированных при pH 4.0 и отмытых с помощью ЭДТА-Na от ионов Mg^{2+} , фенольных веществ. 1 – на участке зоны (обозначена кружком) нанесено 10 мкл 1 М $ZnCl_2$ в спирте, 2 – на участке зоны (обозначена кружком) нанесено 10 мкл 1 М $ZnCl_2$ в воде.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение Zn-феофитинов a и b предусматривает использование препаратов хлорофиллов a и b , феофитинизацию, и замену ионов Mg^{2+} на ионы Zn^{2+} в тетрапиррольном макроцикле [15]. Процедуры такой замены достаточно просты и воспроизводимы [16, 18, 21, 22]. Однако масштабированное производство хроматографически очищенного Zn-феофитина требует затрат на получение высокоочищенных препаратов хлорофилла, использование хроматографического оборудования, токсичных и огнеопасных растворителей. В нашей статье описана методика получения препарата, обогащенного Zn-феофитином без использования хроматографически очищенного хлорофилла, проведением его синтеза в срезанных листьях пшеницы. Такой синтез ранее проводился в срезанных листьях пандана (*Pandanus amaryllifolius*) [23], чая мате (*Ilex paraguariensis*) [24], а также с использованием экстракта шпината [25].

Мы проводили феофитинизацию хлорофиллов в срезанных листьях пшеницы при до-

статочно низким pH, в присутствии ЭДТА-Na, затем отмывали фенольные вещества, ионы Mg^{2+} и металлизировали феофитин цинком. Добавление ЭДТА-Na в среду способствует более эффективной металлизации (рис. 1б). Положительный эффект ЭДТА-Na можно объяснить образованием хелатов Zn-ЭДТА, которые, вероятно, облегчают проникновение ионов Zn^{2+} через эпидермис, устьица в клетки и тилакоиды хлоропластов. Известно [26], что при корневой подкормке пшеницы ионами Zn^{2+} в форме Zn-ЭДТА хелата наблюдалось повышенное накопление этого иона в листьях и зерне, что очень важно для решения проблемы дефицита Zn^{2+} в хлебе из пшениц, произрастающих на почвах, обедненных по цинку. Однако остается открытым вопрос о возможности синтеза Zn-феофитина при такой подкормке. Проведенный нами синтез Zn-феофитина сначала в целых, затем в измельченных листьях показывает возможность такого синтеза не только в срезанных, но и, вероятно, в вегетирующих листьях пшеницы.

Использование в практике растениеводства концентраций ионов Zn^{2+} на один – два порядка меньше по сравнению с использованной нами, вероятно, можно объяснить различными механизмами взаимодействия ионов цинка с вегетирующими и срезанными листьями. По нашим наблюдениям эффективность используемой концентрации Zn^{2+} зависит от некоторых факторов. Один из них – предварительное удаление из листьев фенольных веществ, т.к. они могут экстрагироваться вместе с Zn-феофитином и окисляясь, снижать качество препарата. Чрезмерно высокие концентрации Zn^{2+} (более 100 мМ), использованные для металлизации феофитинов в листьях пшеницы, негативно влияли на экстракцию Zn-феофитина: листья имели вид усохших, даже при замачивании в воде, при этом уменьшался выход Zn-феофитина. Такой эффект можно объяснить дублением белков листа при высокой концентрации цинка [27].

Результаты нашей работы позволяют предположить два механизма связывания ионов цинка с хлорофиллом и феофитином в срезанных листьях пшеницы. По одному из них в центре макроцикла хлорофилла идет обмен ионов Mg^{2+} на ионы Zn^{2+} , а по-другому, Zn^{2+} хелатируется кетоэфирными группами по периферии макроцикла [28].

Феофитинизация хлорофилла в срезанных неизмельченных листьях (рис. 1 а1, б1) не была оптимизирована так, чтобы все участки каждого отдельного листа превращались из зеленых в бурые, т.е. процент феофитинизованных достигал 100%. В литературе предлагаются способы металлизации феофитина ионами Zn^{2+}

с прогреванием слабо зеленых груш при 94°C, 20 мин [29], листьев *Pandanus* при температуре 110°C, затем инкубацией с ионами Zn^{2+} и экстракцией Zn-хлорофилла этанолом [23], обработкой гомогената шпината пульсирующими электрическими полями высокой напряженности (20–100 кВ/см) на протяжении нескольких наносекунд в присутствии ионов цинка [30]. В цитированных работах отсутствуют данные о 100% превращения Mg-хлорофилла в Zn-хлорофилл. Однако феофитинизацией при бланшировании, т.е. кратковременной обработкой листьев паром, кипятком, можно достичь 100% удаления ионов Mg^{2+} из хлорофилла, но на следующем этапе металлизации с помощью ионов Zn^{2+} достичь высокой эффективности практически невозможно. Кроме того, нагревание хлорофилла и его производных приводит к деградации. Показано, что длительное нагревание листьев модифицирует хлорофилл в результате декарбоксиметаллирования и образования пиромфеофитинов [30–32]. Поэтому мы не использовали прогревание в нашей работе. Нельзя полностью исключить обратное встраивание в феофитин освободившихся ионов Mg^{2+} . Эта возможность пока недостаточно изучена. Мы ее учитывали, что подтверждается более интенсивной синей окраской листьев, из которых ионы Mg^{2+} были удалены отмывкой с ЭДТА-Na (рис. 16).

В известной нам литературе, патентах отсутствуют доказательства синтеза Zn-феофитина в пшенице при внекорневой подкормке ионами Zn^{2+} . Более того, результаты, полученные при использовании других растений, свидетельствуют в пользу выбранного нами пути синтеза с использованием срезанных листьев. Так, синтез Zn-хлорофилла происходит в клетках *Chlorella* только при гетеротрофном росте, в темноте, после накопления феофитина, Zn-хлорофилл синтезируется прямым включением ионов цинка в молекулу феофитина [11].

Перспектива возможного применения препарата Zn-хлорофилла для профилактики и лечения вирусных заболеваний, прежде всего COVID-19, в литературе активно обсуждается [5–8]. Предлагаемый нами способ получения Zn-феофитина в срезанных листьях пшеницы перспективен, так как, во-первых, позволяет исследовать фундаментальные особенности взаимодействия тяжелых металлов с хлорофиллом, во-вторых, возможно применение препаратов Zn-феофитина в профилактике и лечении вирусных болезней наряду с методом вакцинации. Известные цинксодержащие и хлорофиллсодержащие препараты, необходимые для стимуляции иммунитета являются искусственными и имеют ряд противопоказаний. Возможная замена на Zn-феофитин является более экологичной, т.к. содержит природное соединение.

Авторы благодарят за обсуждение результатов работы сотрудников ИФПБ РАН в.н.с. к.б.н. Шкуропатов А.Я., с.н.с. к.х.н. Ковалева В.Б., сотрудников лаборатории фотосинтетического окисления воды ИФПБ РАН, а также рецензентов за ценные замечания и предложения.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (122041100274-6).

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. *Ebrahimi P., Shokramraji Z., Tavakkoli S., Mihaylova D., Lante A.* Chlorophylls as natural bioactive compounds existing in food by-products: a critical review // *Plants*. 2023. V. 12. P. 1533. <https://doi.org/10.3390/plants12071533>
2. *Гельфонд М.Л.* Фотодинамическая терапия в онкологии // *Практическая онкология*. 2007. Т. 8. № 4. С. 204.
3. *Mishra V.K., Bacheti R.K., Husen A.* Medicinal uses of chlorophyll: A critical overview. In book: *Chlorophyll: structure, function and medicinal uses* publisher: nova science publishers, Inc., Hauppauge, NY 11788. Ed.: Hua Le and Elisa Salcedo, 2011. P. 1.
4. *Solymsi K., Mysliwa-Kurczel B.* Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine // *Mini Rev. Med. Chem.* 2017. V. 17. P. 1194. <https://doi.org/10.2174/1389557516666161004161411>
5. *Caño-Delgado A.I., Ponz F., Avesani L.* Plant science's contribution to fighting viral pandemics: COVID-19 as a case study // *Front. Plant Sci.* 2022. P. 173. <https://doi.org/10.3389/978-2-88974-157-1>
6. *Clark N.F., Taylor-Robinson A.W.* COVID-19 therapy: could a chlorophyll derivative promote cellular accumulation of Zn^{2+} ions to inhibit SARs-CoV-2 RNA synthesis? // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 1270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01270>
7. *Jimenez-Aleman H.G., Castro V., Longdaitbehere A., Gutierrez-Rodríguez M., Garaigorta U., Solano R., Gastaminza P.* SARS-CoV-2 fears green: the chlorophyll catabolite pheophorbide a is a potent antiviral // *Pharmaceutical*. 2021. V. 14. P. 1048. <https://doi.org/10.3390/ph14101048>
8. *Lebedeva N.Sh., Gubarev Y.A., Koifman M.O., Koifman O.I.* The application of porphyrins and their analogues for inactivation of viruses. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 4368. <https://doi.org/10.3390/molecules25194368>
9. *Kupper H., Kupper F., Spiller M.* Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants // *J. Exp. Bot.* 1996. V. 47. P. 259.
10. *Kupper H., Dedic R., Svoboda A., Hala J., Krones P.M.H.* Kinetics and efficiency of excitation

- energy transfer from chlorophylls, their heavy metal-substituted derivatives, and pheophytins to singlet oxygen // *BBA*. 2002. V. 1572. P. 107.
11. *Ikegami I., Nemoto A., Sakashita K.* The formation of Zn-Chl a in *Chlorella* heterotrophically grown in the dark with an excessive amount of Zn^{2+} // *Plant Cell Physiol*. 2005. V. 46. P. 729.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pci079>
 12. *Hassan M.U., Aamer M., Chattha M.U., Haiying T., Shahzad B., Barbanti L., Nawaz M., Rasheed A., Afzal A., Liu Y., Guoqin H.* The critical role of zinc in plants facing the drought stress // *Agriculture*. 2020. V. 10. P. 396.
<https://doi.org/10.3390/agriculture10090396>
 13. *Ma D., Sun D., Wang C., Ding H., Qin H., Hou J., Huang X., Xie Y., Guo T.* Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress // *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8. P. 860.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00860>
 14. *Chatti D., Kumar A.* Effect of zinc nutrition in mitigating late sowing induced heat stress in wheat crop // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2020. V. 9. P. 2415.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.901.275>
 15. *Евстигнеев В.Б., Оловянишникова Г.Д.* Фотохимические свойства аналогов хлорофилла Zn-феофитинов // *Молекулярная биология*. 1973. Т. 7. С. 195.
 16. *Orzeł Ł., Wasr J., Kania A., Susz A., Rutkowska-Zbik D., Staronr J., Witko M., Stochel G., Fiedor L.* Factors controlling the reactivity of divalent metal ions towards pheophytin a // *J. Biol. Inorg. Chem*. 2017. V. 22. P. 941.
<https://doi.org/10.1007/s00775-017-1472-1>
 17. *Sjursnes B.J., Kvittingen L., Schmid R.* Thin-layer chromatography of green leaves extracts: Zinc migrates into pheophytin on TLC silica plates with fluorescence indicator (F254) // *JPC – J. Planar Chromatogr. – Modern TLC*. 2016. V. 29. P. 480.
<https://doi.org/10.1556/1006.2016.29.6.13>
 18. *Scheer H., Hartwich G.* Bacterial reaction centers with modified tetrapyrrole chromophores. // In: *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 1995. P. 649.
https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_29
 19. *Thorne S.W., Newcomb E.H., Osmond C.B.* Identification of chlorophyll b in extracts of prokaryotic algae by fluorescence spectroscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 575.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.575>
 20. *Христин М.С., Смолова Т.Н., Креславский В.Д.* Тепловой стресс, агрегация хлорофилл-белковых комплексов и светозависимое восстановление активности ФС II проростков пшеницы // *Физиология растений*. 2021. Т. 68. С. 509.
<https://doi.org/10.31857/S0015330321050079>
 21. *Kang Y.-R., Park J., Jung S. K., Chang Y. H.* Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. // *Food Chemistry*. 2018. V. 245. P. 943.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.079>
 22. *Zvezdanovic J., Markovic D.* Copper, iron, and zinc interactions with chlorophyll in extracts of photosynthetic pigments studied by VIS Spectroscopy // *Russ. J. Physic. Chem. A*. 2009. V. 83. P. 1542.
 23. *Senklang P., Anprung P.* Optimizing enzymatic extraction of Zn–chlorophyll derivatives from pandan leaf using response surface methodology // *J. Food Proces. Preservat*. 2010. V. 34. P. 759.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00393.x>
 24. *Scipioni G.P., Argüello B.V., Schmalko M.E.* The effect of Mg^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} pre-treatment on the color of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves // *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2010. V. 53. P. 1497.
 25. *Nelson R.E., Ferruzzi M.G.* Synthesis and bioaccessibility of Fe-pheophytin derivatives from crude spinach extract // *J. Food Sci*. 2008. V. 73. P. H86.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00783>
 26. *Zhao A., Yang S., Wang B., Tian X.* Effects of $ZnSO_4$ and Zn-EDTA applied by broadcasting or by banding on soil Zn fractions and Zn uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions // *J. Plant Nutrit. Soil Sci*. 2019. V. 182. P. 307.
<https://doi.org/10.1002/jpln.201800341>
 27. *Чурсин В., Магомедова П.* Исследование взаимодействий в системе белок – соли цинка – органический дубитель // *Российский химический журнал*. 2020. Т. 64. С. 37.
<https://doi.org/10.6060/rcj.2020642.6>
 28. *Bechaieb R., Fredj A.B., Akachab A.B., Gérard H.* Interactions of copper (ii) and zinc(ii) with chlorophyll: insights from density functional theory studies // *New J. Chem*. 2016. V. 40. P. 4543.
<https://doi.org/10.1039/C5NJ03244J>
 29. *Ngo T., Zhao Y.* Formation of zinc-chlorophyll-derivative complexes in thermally processed green pears (*Pyrus communis* L.) // *J. Food Sci*. 2007. V. 72. P. 397.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00465.x>
 30. *Yongguang Y., Yong H., Jingbo L.* A novel protecting method for visual green color in spinach puree treated by high intensity pulsed electric fields // *J. Food Engineer*. 2007. V. 79. P. 1256.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.031>
 31. *Schwartz S.J., Von Elbe J.H.* Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables // *J. Food Sci*. 1983. V. 48. P. 1303
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb09216.x>
 32. *La Borde L.F., Elbe J.H.* Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables // *J. Agric. Food Chem*. 1994. V. 42. P. 1100.
<https://doi.org/10.1021/jf00041a010>

УДК 581.1

НАКОПЛЕНИЕ ПРОЛИНА, ФЛАВОНОИДОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В ЛИСТЯХ КРЕСС-САЛАТА В УСЛОВИЯХ СОЛЕЩЕЛОЧНОГО СТРЕССА

© 2024 г. А. К. Чернышева^а*, О. З. Еремченко^а, К. И. Богалова^а^аПермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия
*e-mail: nast483@bk.ru

Поступила в редакцию 19.01.2024 г.

После доработки 09.02.2024 г.

Принята к публикации 12.02.2024 г.

Исследовали изменения в содержании пролина, флавоноидов и органических (яблочной, лимонной, янтарной) кислот в растениях кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) на начальном этапе развития соле-щелочного стресса. Двухфакторный эксперимент включил варианты с NaCl-засолением (50, 100, 150, 200 мМ), щелочности (при pH = 7–10) и варианты комбинированного воздействия соли и pH. С помощью двухфакторного дисперсионного анализа с определением силы влияния по Снедекору установили отдельное и взаимное действие факторов стресса на изменение высоты и массы надземной части растений, содержания воды, Na⁺, пролина, флавоноидов и общего содержания органических кислот в листьях. Через 24 и 48 ч после стресс-воздействия изменения высоты и массы кресс-салата были минимальными, сила влияния факторов стресса не более 4–7%. В листьях кресс-салата снизилось содержание воды; эти изменения обусловлены отдельным и взаимным воздействием NaCl-засоления и высоких значений pH на 35–53%. В листьях кресс-салата наблюдали заметное накопление Na⁺, его содержание в первые часы наблюдений зависело от отдельного влияния факторов стресса. Через сутки количество Na⁺ в листьях увеличилось относительно контроля в несколько раз, показатели отдельного и взаимного влияния факторов соле-щелочного стресса достигли 31–33%. Аккумуляция пролина в листьях в большей степени зависела от засоления и взаимного действия факторов стресса (влияние в пределах 26–33%). Влияние высоких значений pH не превышало 21%. Незначительное накопление флавоноидов отмечали только через 1 ч после стресс-воздействия. Установлено, что увеличение суммарного содержания лимонной, яблочной и янтарной кислот в равной степени зависело от отдельного и взаимного влияния факторов, суммарное воздействие NaCl-засоления и высоких значений pH достигало 97–99%. Таким образом, в условиях солещелочного стресса накопление органических кислот и пролина является основой адаптационных процессов в кресс-салате.

Ключевые слова: *Lepidium sativum*, двухфакторный эксперимент, органические кислоты, пролин, солещелочной стресс, флавоноиды

DOI: 10.31857/S0015330324040113, EDN: MNHPZA

ВВЕДЕНИЕ

Солевой стресс и механизмы толерантности растений к засолению в настоящее время остаются в центре внимания исследователей [1, 2, 3]. В природных условиях засоление может сопровождаться щелочной реакцией почвенной среды. Солевой и щелочной стрессы рассматриваются как разные типы стресса; одновременно отмечают, что щелочные соли (Na₂CO₃ + NaHCO₃) оказывают более негативное влияние на культурные растения, по сравнению с нейтральными солями (Na₂SO₄ + NaCl). При щелочном засолении нарушается проницаемость мембран, накапливаются активные формы кислорода, снижаются фотосинтетические показатели, замедляется рост листьев и корней. В основе

адаптации к щелочному засолению находятся антиоксидантная и осмопротекторная защиты, а также активизация процессов pH-регуляции растений [4–8].

Устойчивость растений как к засолению, так и к высоким значениям pH связана с накоплением в растениях низкомолекулярных органических соединений, в том числе пролина, флавоноидов и органических кислот. Пролин проявляет антиоксидантную активность [2, 9], участвует в pH-регуляции [10, 11], а также в осморегуляции цитоплазмы растений при солевом [1] и щелочном стрессе [8, 12]. Флавоноиды стабилизируют мембраны при окислительном стрессе, являются антиоксидантами [13–15]. Органические кислоты восстанавливают осмоти-

ческий баланс растительной клетки в условиях засоления [16, 17]. При воздействии щелочных солей органические кислоты в растениях накапливались в связи с необходимостью рН-гомеостаза [4, 6, 18].

В условиях щелочного засоления отмечали определенную трудность в отделении эффекта засоления от воздействия высоких рН на растения [19, 20]. При выстраивании картины устойчивости растений при воздействии нескольких факторов внешней среды используются статистические методы [7, 19, 21]; так, применение двухфакторного дисперсионного анализа позволило сопоставить влияние видовой принадлежности, микроклиматических условий и их взаимодействия на параметры структуры листа растений [22].

Цель наших исследований – в условиях комбинированного (солещелочного) стресса изучить влияние NaCl-засоления, щелочности и взаимного их действия на накопление пролина, флавоноидов и органических кислот в листьях кресс-салата *Lepidium sativum* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект и условия выращивания. Исследования проводили на растениях кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) сорта Весенний в двухфакторном опыте с комбинированным воздействием NaCl-засоления (50, 100, 150, 200 мМ) и боратного буфера (при рН = 7–10) (табл. 1). Реакцию среды у растворов контролировали на приборе Экотест-120 (“ЭКОНИКС”, Россия).

Сухие семена кресс-салата (2 г) высаживали в умеренно увлажненный вермикулит в контейнеры размером 16×12×7 см. Растения выращивали в течение 6 дней, на 7 день в корневую среду вносили растворы с определенной концентрацией соли и разной реакцией среды (рН).

Определение морфофизиологических и биохимических параметров. Высоту и сырую массу надземной части кресс-салата исследовали через 24 и 48 ч после стресс-воздействия в 25-кратной повторности. Для определения количества воды в листьях через 24 и 48 ч после стресс-воздействия в каждом варианте опыта

отбирали листья десяти растений кресс-салата в 5-кратной повторности. После их высушивания при температуре 60°C (до постоянного веса) по потере воды вычислили относительное содержание воды (в %).

Для изучения содержания натрия, пролина, флавоноидов и органических кислот через 1, 4 и 24 ч после стресс-воздействия проводили сбор листьев. Листья растений фиксировали при температуре 95°C в течение 20 мин и досушивали при 60°C.

Содержание Na⁺ измеряли в водном экстракте листьев методом пламенной фотометрии (ФПА-2 “Загорский оптико-механический завод”, Россия) [23]. Количество пролина установили методом Bates с соавт. [24]. Флавоноиды извлекали 70% раствором этанола; суммарное содержание продуктов взаимодействия с 5% хлоридом алюминия в 95% спирте установили методом спектрофотометрии при длине волны 425 нм (СФ-2000 “ОКБ Спектр”, Россия) [25].

Органические кислоты (лимонную, яблочную и янтарную) измеряли в водном экстракте листьев растений методом обращено-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией при длине волны 263 нм (Ultimate 3000 “Dionex”, США). Тип колонки: “Polar Advantage II C18” (“Thermo Fisher Scientific”, США) 2.1×150 мм, 3 мкм, 120 Å. Подвижная фаза: элюент А – фосфатный буфер рН = 2.5, 20 мМ, элюент Б – ацетонитрил ОСЧ сорт 0, скорость потока 0.19 мл/мин, режим элюирования градиентный: 0–3.0 мин элюент Б 5%; 3.0–3.5 мин элюент Б до 10%; 3.5–6.5 мин элюент Б 10%; 6.5–7.5 мин элюент Б до 25%; 7.5–10 мин элюент Б 25%; 10–2 мин элюент Б до 5%. Объем ввода пробы 20 мкл [26].

Все биохимические определения проведены в трехкратной биологической и двукратной аналитической повторности.

Математическая обработка данных. Математическую обработку данных проводили с помощью статистической диалоговой системы STADIA 8.0. Распределение данных по высоте и массе кресс-салата не отличались от нормального распределения (уровень значимости $P = 0.06–0.87$), тестировали по критериям

Таблица 1. Схема двухфакторного эксперимента (варианты опыта)

NaCl 0 мМ + рН = 7	NaCl 0 мМ + рН = 8	NaCl 0 мМ + рН = 9	NaCl 0 мМ + рН = 10
NaCl 50 мМ + рН = 7	NaCl 50 мМ + рН = 8	NaCl 50 мМ + рН = 9	NaCl 50 мМ + рН = 10
NaCl 100 мМ + рН = 7	NaCl 100 мМ + рН = 8	NaCl 100 мМ + рН = 9	NaCl 100 мМ + рН = 10
NaCl 150 мМ + рН = 7	NaCl 150 мМ + рН = 8	NaCl 150 мМ + рН = 9	NaCl 150 мМ + рН = 10
NaCl 200 мМ + рН = 7	NaCl 200 мМ + рН = 8	NaCl 200 мМ + рН = 9	NaCl 200 мМ + рН = 10

Колмогорова и омега-квадрат. Значимость различий между средними значениями контроля и опыта по измеренным показателям оценивали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями по критерию Фишера и наименьшей существенной разнице (HCP_{05}). Сила влияния факторов определена по Снедекору, при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Высота и масса растений

Через 24 ч после стресс-воздействия наблюдали значимое снижение высоты кресс-салата в варианте с отдельным воздействием щелочности ($pH = 8$) и при комбинированном воздействии факторов стресса, особенно при максимальном засолении (табл. 2). Во второй период наблюдений (48 ч) высота растений в условиях солещелочного стресса не отличалась от высоты растений в контрольном варианте опыта ($NaCl$ 0 мМ + $pH = 7$), значимое уменьшение высоты наблюдали лишь в варианте $NaCl$ 200 мМ + $pH = 8$.

По результатам двухфакторного дисперсионного анализа в первый период наблюдений влияние факторов солещелочного стресса на высоту кресс-салата было небольшим, показатели отдельного влияния засоления, а также взаимного действия факторов составили по 6–7%. Через 48 ч влияние высоких значений pH и взаимного действия на высоту кресс-салата осталось низким – 4% (рис. 1).

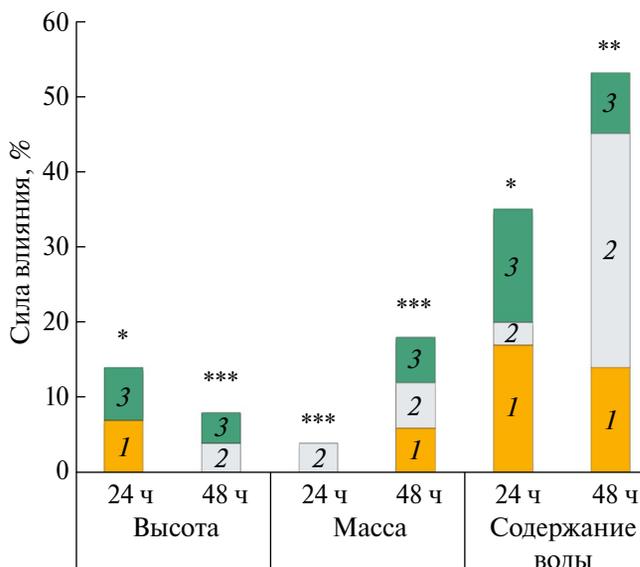


Рис. 1. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа высоты, массы и содержания воды в растениях кресс-салата в зависимости от 1 – $NaCl$ -засоления ($NaCl$), 2 – щелочности (pH) и 3 – взаимного действия этих факторов ($NaCl + pH$) в условиях солещелочного стресса; влияние факторов значимо: * – при уровне $P \leq 0.015$; ** – $P \leq 0.001$; *** – $P \leq 0.0001$.

Значимое снижение массы надземной части кресс-салата через 24 ч после стресс-воздействия наблюдали лишь в одном варианте опыта ($NaCl$ 200 мМ + $pH = 8$) относительно растений в кон-

Таблица 2. Изменение высоты и сырой массы надземной части кресс-салата, содержание воды в листьях при соле-щелочном стрессе

Период наблюдений, ч	pH	Высота, мм					Масса, мг					Содержание воды, %				
		NaCl, мМ														
		0	50	100	150	200	0	50	100	150	200	0	50	100	150	200
24	7	27	27	27	25	23	11.1	12.0	12.5	11.5	12.2	90.1	90.2	90.1	89.7	88.4
	8	24	27	27	25	24	9.6	8.9	9.5	8.8	8.2	89.8	85.2	87.2	86.4	85.8
	9	26	24	26	23	24	9.3	9.1	10.5	9.1	9.7	87.6	86.9	88.3	87.8	87.5
	10	25	26	23	25	24	9.5	12.1	9.0	10.6	10.0	87.6	86.2	87.8	87.5	87.7
	$HCP_{05} = 2.4$					$HCP_{05} = 2.6$					$HCP_{05} = 1.63$					
48	7	27	29	29	29	29	10.7	11.0	12.3	12.3	11.4	89.4	90.4	90.1	88.6	87.0
	8	26	29	28	25	23	7.1	7.8	10.0	10.6	9.1	83.3	82.6	85.3	85.1	81.6
	9	26	25	27	25	25	10.2	10.1	10.5	8.7	10.2	87.1	87.6	86.6	85.0	85.1
	10	29	27	27	29	29	7.3	8.2	9.4	11.0	10.4	82.0	82.4	85.3	86.2	84.3
	$HCP_{05} = 2$					$HCP_{05} = 1.4$					$HCP_{05} = 1.96$					

Примечание: HCP_{05} – наименьшая существенная разность при $P < 0.05$.

троле (табл. 2). Через 48 ч после стресс-воздействия уменьшение массы растений было отмечено в шести вариантах опыта как при отдельном действии факторов засоления и высоких значений рН, так и при их комбинированном действии. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что в первый период наблюдений небольшое влияние на массу растений оказывал фактор высоких значений рН (4%). Во второй период наблюдений показатели отдельного влияния NaCl-засоления, высоких значений рН и их взаимного действия на массу кресс-салата составили 6–7% (рис. 1).

Содержание воды

Через 24 ч развития солещелочного стресса пониженное содержание воды в листьях кресс-салата наблюдали в большинстве вариантах опыта, по сравнению с контролем (табл. 2). Через 48 ч после стресс-воздействия потери воды в листьях кресс-салата увеличились.

В первый период наблюдений на содержание воды почти в равной степени воздействовал фактор засоления (показатель влияния 17%)

и взаимное действие факторов (15%). Во второй период наблюдений при некотором снижении влияния засоления и взаимного действия факторов на количество воды существенно усилилось отдельное воздействие высоких значений рН – до 31%. Суммарное влияние стресс-факторов на изменение количества воды в кресс-салате усиливалось с 35% в первый период наблюдений и до 53% – во второй период наблюдений (рис. 1).

Содержание Na⁺

В условиях соле-щелочного стресса отмечали тенденцию к накоплению Na⁺ в листьях кресс-салата (табл. 3). Через 1 ч после стресс-воздействия повышенное количество Na⁺ наблюдали в шести вариантах опыта при комбинировании засоления и высоких значений рН; при этом в варианте NaCl 200 мМ + рН = 10 содержание Na⁺ было вдвое выше, чем на контроле. Во второй период наблюдений (4 ч) содержание Na⁺ увеличилось, особенно, в вариантах NaCl 150, 200 мМ при всех уровнях рН. Через сутки после стресс-воздействия аккумуляция

Таблица 3. Изменение содержания Na⁺ и пролина в листьях кресс-салата при солещелочном стрессе, мг/100 г сухой массы

Период наблюдений, ч	рН	Na ⁺					Пролин				
		NaCl, мМ									
		0	50	100	150	200	0	50	100	150	200
1	7	105	92	113	146	96	222	607	1254	502	722
	8	122	151	176	117	126	375	689	313	260	790
	9	138	176	147	117	185	571	574	703	453	626
	10	117	105	206	169	219	612	676	270	726	547
	НСР ₀₅ = 52					НСР ₀₅ = 108					
4	7	143	181	147	176	245	186	478	1126	397	475
	8	159	193	227	211	236	183	785	206	654	516
	9	126	172	176	257	270	277	486	329	835	204
	10	126	113	168	219	253	428	379	859	507	558
	НСР ₀₅ = 46					НСР ₀₅ = 113					
24	7	150	383	453	1066	1816	330	281	311	488	1105
	8	164	176	654	1961	2234	335	624	638	641	957
	9	194	253	453	1724	2139	329	656	619	1084	836
	10	182	677	515	1316	1888	380	547	559	1349	1124
	НСР ₀₅ = 69					НСР ₀₅ = 148					

Примечание: НСР₀₅ – наименьшая существенная разность при P < 0.05.

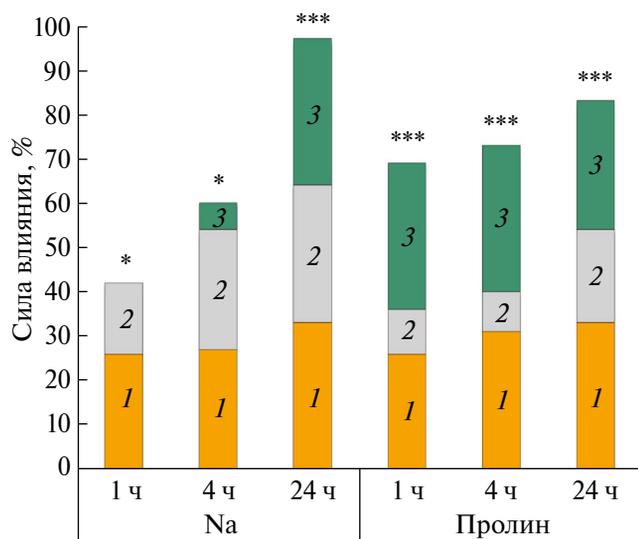


Рис. 2. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа содержания Na^+ и пролина в растениях кресс-салата в зависимости от 1 – NaCl-засоления (NaCl), 2 – щелочности (pH) и 3 – взаимного действия этих факторов (NaCl + pH) в условиях соле-щелочного стресса; влияние факторов значимо: * – при уровне $P \leq 0.015$; *** – $P \leq 0.0001$.

Na^+ в кресс-салате еще усилилась, в вариантах 150 и 200 мМ NaCl при всех значениях pH его количество было в 7–15 раз выше, чем у растений в контрольном варианте опыта.

В первый период наблюдений на содержание Na^+ в листьях кресс-салата влияли засоление и высокие значения pH, при этом показатель засоления был выше (рис. 2). Через 4 ч после стресс-воздействия заметно усилилось воздействие высоких значений pH. В третий период наблюдений изменение содержания Na^+ в равной степени зависело как от отдельных факторов стресса, так и от взаимного их действия. Суммарное влияние факторов возрастало от 42% через 1 ч, до 60% – через 4 ч и до 97% – через 24 ч развития солевщелочного стресса.

Содержание пролина

В условиях солевщелочного стресса в кресс-салате наблюдали аккумуляцию пролина почти во всех вариантах опыта по сравнению с контролем (табл. 3). В первые часы наблюдений наибольшее количество пролина было в варианте NaCl 100 мМ + pH = 7, контрольный уровень превышен в 5–6 раз. Через сутки после стресс-воздействия максимальное содержание пролина отмечали в вариантах NaCl 150, 200 мМ + pH = 10, где его количество в 3.5–4 раза выше, чем в контрольных растениях.

Накопление пролина в наибольшей степени зависело от засоления и взаимного дей-

ствия факторов стресса, показатели влияния находились в пределах 26–33%. Воздействие высоких значений pH на содержание пролина несколько ниже, при этом показатели влияния возрастали с 9–10% – в первые часы наблюдений и до 21% – через сутки. Суммарное действие стресс-факторов на содержание пролина за период наблюдений увеличилось от 69 до 83% (рис. 2).

Содержание флавоноидов

Через 1 ч после стресс-воздействия, как правило, наблюдали накопление флавоноидов в листьях кресс-салата; лишь в варианте pH = 8 без засоления количество флавоноидов не отличалось от контрольного уровня (табл. 4). Самая высокая аккумуляция флавоноидов (больше контроля на 53%) была в варианте с наибольшим засолением (NaCl 200 мМ + pH = 7). В последующий период наблюдений содержание флавоноидов было ниже или не отличалось от их содержания в контрольных растениях.

Через 1 ч после стресс-воздействия суммарное влияние показателей стресса на содержание флавоноидов составляло 32%, а наибольшим было воздействие высоких значений pH (рис. 3). В последующий период наблюдений на фоне отсутствия аккумуляции флавоноидов показатели суммарного влияния факторов стресса снизились во второй и третий период наблюдений до 9 и 15% соответственно.

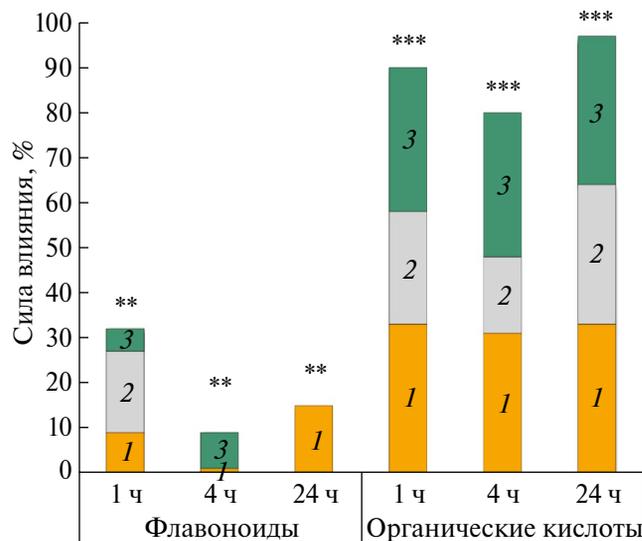


Рис. 3. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа содержания флавоноидов и суммы органических кислот (лимонной, яблочной и янтарной) в растениях кресс-салата в зависимости от 1 – NaCl-засоления (NaCl), 2 – щелочности (pH) и 3 – взаимного действия этих факторов (NaCl + pH) в условиях соле-щелочного стресса; влияние факторов значимо: ** – $P \leq 0.001$; *** – $P \leq 0.0001$.

Таблица 4. Изменение содержания флавоноидов и органических кислот (лимонной, яблочной и янтарной) в листьях кресс-салата при соле-щелочном стрессе

Период наблюдений, ч	рН	Флавоноиды, мг/100 г сухой массы					Сумма органических кислот, мг/10 г сухой массы				
		NaCl, мМ									
		0	50	100	150	200	0	50	100	150	200
1	7	297	374	381	329	455	335	380	492	521	419
	8	292	384	424	393	416	375	403	511	506	509
	9	352	381	430	438	350	382	434	438	482	454
	10	378	443	423	451	414	404	494	450	508	468
	HCP ₀₅ = 55					HCP ₀₅ = 18					
4	7	360	399	332	352	318	446	543	557	469	458
	8	347	305	375	277	331	460	583	592	518	502
	9	344	392	339	339	283	499	549	569	517	503
	10	356	340	366	323	290	620	579	496	471	536
	HCP ₀₅ = 41					HCP ₀₅ = 26					
24	7	323	277	245	178	224	463	561	577	651	437
	8	253	285	251	249	216	496	654	619	596	457
	9	259	334	184	285	246	509	645	683	567	628
	10	310	338	267	288	231	637	575	656	581	631
	HCP ₀₅ = 78					HCP ₀₅ = 28					

Примечание: HCP₀₅ – наименьшая существенная разница при P < 0.05.

Содержание органических кислот

В условиях развития солещелочного стресса установлено увеличение содержания лимонной, яблочной и янтарной кислот в листьях кресс-салата (табл. 4). Через 1 ч после стресс-воздействия наибольшее накопление органических кислот наблюдали в варианте опыта с NaCl 150 мМ + рН = 7, через 4 ч – в варианте рН = 10 без засоления, а через 24 ч – в варианте NaCl 100 мМ + рН = 9 (выше контроля на 55%).

Влияние факторов солещелочного стресса на содержание органических кислот в кресс-салате было максимально высоким, сумма показателей влияния достигала 80–97% (рис. 3). Одинаково высоким было отдельное действие засоления и взаимное действие факторов стресса, их показатели влияния достигали 31–33%. В первые часы наблюдений на аккумуляцию органических кислот в меньшей степени воздействовали высокие значения рН (17–25%), но через сутки развития солещелочного стресса показатель влияния рН увеличился до 31%.

ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 24–48 ч развития солещелочного стресса влияние факторов на изменение морфологических показателей кресс-салата было минимальным (показатели влияния на высоту и массу в пределах 4–7%); по-видимому, негативное воздействие щелочного засоления не успело реализоваться за этот период наблюдений.

Прослежено отрицательное влияние засоления на содержание воды в кресс-салате, что соответствует информации о нарушении осморегуляции и уменьшении доступности воды растениям на первой стадии развития солевого стресса [2, 27]. Через 48 ч после стресс-воздействия снижение содержания воды в растении в большей степени зависело от высоких значений рН. Щелочная среда нарушает строение и функции клеточных мембран, по А.А. Захарину и Л.А. Паничкину [28] при избытке ионов гидроксила снижалась проницаемость воды для клеток корня. При этом обезвоживание клеток корня происходило в 2 раза сильнее, чем под воздействием раствора NaCl той же концентрации.

При развитии сощелочного стресса аккумуляция Na^+ в кресс-салате в значительной степени определялась фактором засоления. Известно, что ионный гомеостаз в растениях при засолении поддерживается с помощью активного транспорта Na^+ , в том числе при участии белков – антипортеров [3]. Концентрация засоляющих ионов в цитозоле гликофитов до определенного уровня не считается проблематичной [20]. Их накопление в условиях засоления позволяет растению поглощать воду даже при снижении интенсивности транспирации [29].

В нашем эксперименте на количество Na^+ в кресс-салате в значительной степени воздействовали высокие значения рН. Воздействие щелочных растворов на растение приводит к изменению градиента трансмембранного электрохимического потенциала и нарушению транспорта ионов [4, 6, 30]. Через 24 ч после стресс-воздействия в изменение содержания Na^+ не меньший вклад вносило взаимное действие факторов соле-щелочного стресса, т.к. нарушение состояния мембран под влиянием высоких значений рН может привести к бесконтрольному поступлению Na^+ в растения [17, 19, 30].

Ответной реакцией растений на дефицит воды является аккумуляция низкомолекулярных соединений в клетке [2, 27, 31]. В нашем эксперименте увеличение содержания пролина под влиянием NaCl -засоления соотносится с данными по накоплению пролина в листьях культурных растений в условиях солевого стресса [6, 7, 32]. Количество пролина в листьях кресс-салата в определенной степени зависело и от высоких значений рН корневой среды, что может быть обусловлено участием пролина в рН-регуляции цитоплазмы растений [10, 11].

С избыточным накоплением Na^+ связывают окислительный стресс растений [3]. Проллин поддерживает окислительно-восстановительный баланс за счет участия в нейтрализации активных форм кислорода [9, 34]. При щелочном стрессе аккумуляция пролина в проростках пшеницы обеспечивала защиту от окислительного повреждения [12]. Возможно, взаимное действие факторов сощелочного стресса на содержание пролина в кресс-салате обусловлено его антиоксидантной активностью.

Аккумуляцию флавоноидов в растениях связывают с их способностью к антиоксидантной активности и стабилизации мембран при окислительном стрессе [15]. Отмечали высокую антиоксидантную активность флавоноидов, во многом превосходящую активность других антиоксидантов (аскорбиновой кислоты и α -токоферола) [14]. Вероятно, через 1 ч после стресс-воздействия накопление флавоноидов в кресс-салате под влиянием факторов сощелочного стресса было направлено на защиту от

окислительного повреждения. В последующем в антиоксидантную защиту включались другие участники, и количество флавоноидов в листьях кресс-салата уменьшалось. Общая активность радикальных окислительных процессов, жизненно важных для поддержания гомеостаза клеток высших растений, поддерживается разными представителями антиоксидантной системы [35].

Органические кислоты участвуют в рН-гомеостазе, осмотической регуляции и балансе избытка катионов [4, 18]. С этим связано высокое отдельное и взаимное влияние засоления и высоких значений рН на накопление яблочной, лимонной и янтарной кислот в кресс-салате в условиях сощелочного стресса. Органические кислоты восстанавливали водный баланс растительных клеток при засолении [5, 6, 16]. Ответом на действие щелочных солей было накопление органических кислот (щавелевая, лимонная, яблочная, муравьиная, этиловая, янтарная), как в побегах, так и в корнях растений [5, 19].

Наши исследования показали, что в первые часы развития сощелочного стресса в кресс-салате наибольшие изменения произошли в метаболизме органических кислот. Общее накопление лимонной, яблочной и янтарной кислот в равной степени связано с отдельным и взаимным действием NaCl -засоления и высоких значений рН, что указывает на их осмо- и рН-регулирующее значение. Аккумуляция пролина в первые часы наблюдений зависела преимущественно от засоления и взаимного действия факторов, влияние высоких значений рН было наименьшим. По-видимому, в условиях сощелочного стресса основная роль пролина направлена на осморегуляцию и защиту от окислительного повреждения. Участие флавоноидов в адаптационных процессах наблюдали лишь в первый час после стресс-воздействия, возможно, их накопление в это время направлено на защиту мембран от свободно-радикального повреждения.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Volkov V., Beilby M.J. Salinity tolerance in plants: Mechanisms and regulation of ion transport // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1795. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01795>
2. Arif Y., Singh P., Siddiqui H., Bajguz A., Hayat S. Salinity induced physiological and biochemical changes

- in plants: An omic approach towards salt stress tolerance // *Plant Physiol. Biochem.* 2020. V. 156. P. 64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>
3. Amin I., Rasool S., Mir M.A., Wani W., Masoodi K.Z., Ahmad P. Ion homeostasis for salinity tolerance in plants: A molecular approach // *Physiol. Plant.* 2021. V. 171. P. 578. <https://doi.org/10.1111/ppl.13185>
 4. Yang C., Wang P., Li C., Shi D., Wang D. Comparison of effects of salt and alkali stresses on the growth and photosynthesis of wheat // *Photosynthetica.* 2008. V. 46. P. 107. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0018-8>
 5. Guo R., Shi L., Ding X., Hu Y., Tian S., Yan D., Yang Y. Effects of saline and alkaline stress on germination, seedling growth, and ion balance in wheat // *Agron. J.* 2010. V. 102. P. 1252. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0022>
 6. Liu J., Shi D. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, inorganic ion and organic acid accumulations of sunflower in responses to salt and salt-alkaline mixed stress // *Photosynthetica.* 2010. V. 48. P. 127. <https://doi.org/10.1007/s11099-010-0017-4>
 7. Guo R., Yang Z., Li F., Yan C., Zhong X., Liu Q., Xia X., Li H. Zhao L. Comparative metabolic responses and adaptive strategies of wheat (*Triticum aestivum*) to salt and alkali stress // *BMC Plant Biol.* 2015. V. 15. P. 170. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0546-x>
 8. Hou R., Yang L., Wuyun T., Chen S., Zhang L. Genes related to osmoregulation and antioxidation play important roles in the response of *Trollius chinensis* seedlings to saline-alkali stress // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14. P. 1080504. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1080504>
 9. Carvalho K., Campos M.K., Domingues D.S., Pereira L.F., Vieira L.G. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo // *Mol. Biol. Rep.* 2013. V. 40. P. 3269. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2402-5>
 10. Zhu J.K. Plant salt tolerance // *Trends Plant Sci.* 2001. V. 6. P. 66. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01838-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0)
 11. Krishnan N., Dickman M.B., Becker D.F. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress // *Free Radical Biol. Med.* 2008. V. 44. P. 671. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.054>
 12. Borhannuddin Bhuyan M.H.M., Hasanuzzaman M., Mahmud J.A., Hossain M.S., Bhuiyan T.F., Fujita M. Unraveling morphophysiological and biochemical responses of *Triticum aestivum* L. to extreme pH: coordinated actions of antioxidant defense and glyoxalase systems // *Plants.* 2019. V. 8. P. 24. <https://doi.org/10.3390/plants801002>
 13. Gould K.S., Lister C. Flavonoid functions in plants. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.* CRC Press LLC: Boca Raton, FL, USA, 2006. P. 397.
 14. Khlestkina E. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals // *Cereal Res. Commun.* 2013. V. 41. P. 185. <https://doi.org/10.1556/crc.2013.0004>
 15. 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>
 16. Чжюу К., Юй В.Дж. Накопление неорганических и органических осмолитов и их роль в осмотической регуляции у проростков *Vetiveria zizanioides* при действии NaCl // *Физиология растений.* 2009. Т. 56. С. 751.
 17. Zhang H., Liu X.L., Zhang R.X., Yuan H.Y., Wang M.M., Yang H.Y., Ma H.Y., Liu D., Jiang C.J., Liang Z.W. Root damage under alkaline stress is associated with reactive oxygen species accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1580. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01580>
 18. López-Bucio J., Nieto-Jacobo M.F., Ramírez-Rodríguez V., Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils // *Plant Sci.* 2000. V. 160. P. 1. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00347-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00347-2)
 19. Shi D., Wang D. Effects of various salt-alkaline mixed stresses on *Aneurolepidium chinense* (Trin.) Kitag. // *Plant Soil.* 2005. V. 271. P. 15. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1307-z>
 20. Genc Y., Taylor J., Lyons G., Li Y., Cheong J., Applebee M., Oldach K., Sutton T. Bread wheat with high salinity and sodicity tolerance // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1280. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01280>
 21. Иванищев В.В., Евграшкина Т.Н., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Засоление почвы и его влияние на растения // *Известия Тульского государственного университета. Науки о земле.* 2020. № 3. С. 28.
 22. Иванова Л.А., Чанчикова А.Г., Ронжина Д.А., Золотарева Н.В., Косильников В.В., Кадушников Р.М., Иванов Л.А. Акклимация листьев луговых растений разных функциональных типов к экспериментальному потеплению климата // *Физиология растений.* 2016. Т. 63. С. 860. <https://doi.org/10.7868/S0015330316050067>
 23. Кусакина М.Г., Суворов В.И., Чудинова Л.А. Большой практикум “Биохимия”. Лабораторные работы: учеб. Пособие. Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2012. 148 с.
 24. Bates L., Waldren P.P., Teare J.D. Rapid determination of proline of water stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. P. 205. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
 25. Курдюков Е.Е., Водопьянова О.А., Мусеева И.Я., Семенова Е.Ф. Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях моринги масличной (*Moringa oleifera*) // *Вест. Моск. ун-та. Сер 2. Химия.* 2021. Т. 62. С. 380.

26. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 240 с.
27. Веселов Д.С., Маркова И.В., Кудоярова Г.Р. Реакция растений на засоление и формирование солеустойчивости // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. № 5. С. 482.
28. Захарин А.А., Паничкин Л.А. Модель протонного барьера. Полная односторонняя проницаемость клеток корня для воды под влиянием избытка протонов в апопласте // Известия ТСХА. 2005. № 3. С. 69.
29. Орлова Ю.В., Майорова О.В., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Неделяева О.И., Попова Л.Г., Балнокин Ю.В. Накопление и распределение неорганических ионов в тканях органов галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. в условиях засоления // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3. С. 107. <https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-4-3-107-114>
30. Guo R., Yang Z., Li F., Yan C., Zhong X., Liu Q., Xia X., Li H., Zhao L. Ionic and metabolic responses to neutral salt or alkaline salt stresses in maize (*Zea mays* L.) seedlings // BMC Plant Biol. 2017. V. 17. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0994-6>
31. Roy S.J., Negrão S., Tester M. Salt resistant crop plant // Curr. Opin. Biotechnol. 2014. V. 26. P. 115. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.004>
32. Yan H., Zhao W., Sheng Y., Shi D., Zhou D. Effects of alkali-stress on *Aneurolepidium chinense* and *Helianthus annuus* // Chin. J. Appl. Ecol. 2005. V. 16. P. 1497.
33. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 321.
34. Радюкина Н.Л., Шашкунова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов В.В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты шалфея при действии NaCl и параквата // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 721.
35. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник МГПУ. Сер. Естественные науки. 2016. Т. 2. № 22. С. 9.