

ISSN 0015-3303

Том 70, Номер 3

Май - Июнь 2023



ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 70, номер 3, 2023

ОБЗОРЫ

Вторичный метаболизм в культуре клеток *in vitro* *Taxus* spp.

С. В. Томилова, Е. Б. Глоба, Е. В. Демидова, А. М. Носов

227

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Коэкспрессия структурных и регуляторных генов флавоноидного пути выявляет особенности биосинтеза антоцианов в органах баклажана (*Solanum melongena* L.)

М. А. Филюшин, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева

241

Влияние предпосевной обработки семян салициловой кислотой на рост и фотосинтетический аппарат ячменя при разном содержании цинка в субстрате

А. А. Игнатенко, Ю. В. Батова, Е. С. Холопцева, Н. М. Казнина

251

Повышение устойчивости растений к засухе с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*

З. М. Курамшина, Р. М. Хайруллин

259

Характеристика нового галотолерантного арктического штамма каротиногенной микроводоросли *Halochlorella rubescens* NAMSU SBB-20

А. А. Зайцева, Д. А. Бахарева, П. А. Зайцев, Е. С. Лобакова

269

Роль киназы SnRK1 в ответе фотосинтетического аппарата на солевой стресс

А. В. Муртузова, Е. В. Тотерева, О. В. Войцеховская

279

Повышение толерантности *Triticum aestivum* L. к солевому стрессу с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*

З. М. Курамшина, Р. М. Хайруллин

293

Влияние низкой температуры и азотного голодания на морфо-физиологические характеристики двух штаммов зеленых микроводорослей рода *Lobosphaera* sp. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)

К. А. Шибзухова, О. Б. Чивкунова, Е. С. Лобакова

301

Влияние продолжительности фотопериода на эффективность низкотемпературного закаливания *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.)

В. Н. Попов, А. Н. Дерябин

311

Устойчивость к альтернариозу трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген антимикробных пептидов *ProSmAMP1* под контролем светоиндуцибельного промотора *Cab*

Д. В. Беляев, Н. О. Юрьева, Д. В. Терешонок,
М. К. Деревягина, А. А. Мелешин

319

Характеристика комплекса полифенольных соединений эндемика Якутии *Dracoscephalum jacutense* Peschkova с использованием метода tandemной масс-спектрометрии

Ж. М. Охлопкова, М. П. Разгонова, П. С. Егорова, К. С. Голохваст

327

ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *IN VITRO* *Taxus* spp.

© 2023 г. С. В. Томилова^{а, *}, Е. Б. Глоба^а, Е. В. Демидова^а, А. М. Носов^{а, б, **}

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

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

*e-mail: lanatomilova@yandex.ru

**e-mail: al_nosov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.12.2022 г.

После доработки 23.12.2022 г.

Принята к публикации 23.12.2022 г.

Род *Taxus* (тис) является источником ряда фармацевтически ценных веществ, в частности паклитаксела (таксола) — сложного diterпеноидного соединения с мощным противоопухолевым действием (коммерческое название — Taxol®). Паклитаксел является одним из самых успешных препаратов в химиотерапии, благодаря своему специфическому действию на подавление пролиферации опухолевых клеток в опухолях путем стабилизации их микротрубочек. Мировой спрос на таксол составляет 800–1000 кг в г., и этот показатель ежегодно увеличивается на 20%. Растущая потребность в паклитакселе и его производных и, как следствие, дефицит растительных ресурсов для их получения, сделал соединения таксанового ряда одним из наиболее важных объектов для разработки биотехнологических способов их производства. Из всех возможных методов получения таксола (из дикорастущих или выращенных на плантациях деревьев, полный химический синтез или полусинтез, использование культур клеток тиса, технологии метаболической инженерии, использование эндофитных грибов тиса) наиболее многообещающим представляется промышленное выращивание культур клеток *Taxus* spp. В представленном обзоре проведен анализ работ, посвященных изучению вторичного метаболизма в дедифференцированных клетках *in vitro* разных видов тиса и возможностям промышленного применения культур клеток для получения таксоидов. Выявлен ряд закономерностей, характерных для культур клеток *Taxus* spp.: для цитофизиологических аспектов — сложность получения культур клеток, их низкие ростовые характеристики, специфические среды и условия культивирования; для фитохимических аспектов — отличия, по сравнению с интактными растениями, в качественном составе и количественном содержании вторичных метаболитов, которые обусловлены спецификой культуры клеток как биологической системы; образование преимущественно С14-гидроксированных, но не С13-гидроксированных таксоидов; возможность повышения уровня содержания таксоидов — в том числе коммерчески ценных (паклитаксела, бакатина III) с применением различных подходов (элиситация, стрессовые воздействия, двухфазное культивирование и ряд других); для биотехнологических аспектов — возможность промышленного выращивания культур клеток тиса; наличие нескольких успешных производств (Германия, Республика Корея).

Ключевые слова: *Taxus* spp., вторичный метаболизм, культура клеток высших растений, паклитаксел, таксоиды, тис

DOI: 10.31857/S0015330322600784, EDN: IBVNQP

ВВЕДЕНИЕ

Род *Taxus*, широко известный как тис, относится к голосеменным растениям семейства *Taxaceae*. Тис является источником фармацевтически ценных соединений, в частности противоопухолевого препарата Taxol® (паклитаксел) [1].

Паклитаксел — это один из самых успешных препаратов в химиотерапии, годовой объем его продаж в 2000 г. превысил 1.5 миллиарда долларов США. Однако история его применения имела

много сложностей, и в ряде случаев он был практически отброшен как лидирующий препарат (низкая растворимость в воде, структурная сложность, отсутствие большого и возобновляемого запаса ресурсов для получения чистого вещества) [2].

Мировой спрос на таксол составляет 800–1000 кг в г., при этом показатель растет со скоростью 20% ежегодно. Содержание паклитаксела в коре тиса находится на уровне 0.01–0.03%, при этом для полного режима противоопухолевого лечения требуется до 2 г чистого вещества. Высокий спрос

на растение в сочетании с низким накоплением целевого соединения и медленным ростом дерева привели к риску полного уничтожения многих видов рода *Taxus* [3].

Первоначально для получения паклитаксела осуществлялся сбор коры тихоокеанских тисов (*T. brevifolia* Nutt.). Однако из-за ограниченной доступности целевого соединения (0.01% от сухого веса коры), медленного роста растения и запрета на экспорт растительного продукта (поскольку удаление коры в массовом порядке приводит к гибели дерева) спрос на альтернативные источники противоопухолевого вещества значительно возрос. К альтернативным способам получения таксола можно отнести плантационные посадки, полный химический синтез, полусинтез (химический синтез из баккатина III и 10-деацетилбаккатина III), культуры клеток *in vitro* *Taxus* spp., создание продуцентов (в том числе бактериальных и грибных) методами метаболической инженерии, использование эндофитных грибов тиса [4, 5].

В 1991 г. начали изучать микроорганизмы — эндофиты *T. brevifolia* в поисках гриба или бактерии, которые могли бы продуцировать паклитаксел *de novo*. Несмотря на способность эндофитных грибов тиса продуцировать целевое соединение, скорость образования и концентрация вещества оставались очень низкими [5, 6].

В 1994 г. впервые было сообщено о полном химическом синтезе паклитаксела [5]. Считается, что его биосинтез в растении включает приблизительно 19–20 стадий [7–9]. Паклитаксел представляет собой сложную молекулу, содержащую более 11 хиральных центров и уникальную химию оксетанового кольца, его полный органический синтез до сих пор не привел к какому-либо экономически эффективному способу получения соединения. Промежуточный продукт паклитаксела, 10-деацетилбаккатин III, был химически модифицирован для получения полусинтетической версии таксола в 1990 г. и использовался в качестве основного пути поставки соединения компанией Bristol Myers Squibb более десяти лет [5, 10].

Культуры клеток *Taxus* spp. считаются многообещающим способом производства высококачественного растительного сырья для выделения паклитаксела [8]. В 1991 г. был выдан первый патент на суспензионную культуру клеток *T. brevifolia* для получения таксола (заявленный выход соединения — 1–3 мг/л). В 1995 г. компания Phyton Biotech лицензировала свой процесс производства вещества для Bristol Myers Squibb. В настоящее время мировые поставки паклитаксела осуществляются компанией Phyton Biotech (Германия) [11].

Целью настоящего обзора является рассмотрение основных закономерностей вторичного метаболизма в культуре клеток *Taxus* spp.

СИСТЕМАТИКА И РАСПРОСТРАНЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА *Taxus*

Род *Taxus* — это хвойные деревья или кустарники семейства *Taxaceae* высотой 3–9 м, редко до 25 м. Разные виды тиса широко распространены во влажных лесах умеренной зоны по всему миру, особенно на Тихоокеанском и Атлантическом побережьях, в районах Великих озер Северной Америки, в Западной, Северной и Южной Европе, Алжире, на юго-востоке России, в Восточном Китае, Непале, Бирме, Лаосе, Таиланде, Вьетнаме, Иране, на островах Суматра и Целебес [12, 13].

T. baccata L. был первым видом тиса, который описан Карлом Линнеем в 1753 г. На сегодняшний день по морфологическим признакам выделяют 24 вида и 55 разновидностей рода *Taxus* [12, 13].

Виды подразделяются на три группы по различиям в эпидермальных и устьичных признаках листьев. Группа *Wallichiana* с 11 видами встречается от центральных Гималаев до Индонезии и Филиппин, в Северной Америке (на северо-западе Тихого океана) и от Мексики до Центральной Америки с изолированным появлением во Флориде; группа *Baccata* с 9 видами — в умеренной Евразии, Северной Африке и восточной части Северной Америки; группа *Sumatrana* с 4 видами перекрывается по распространению с *Wallichiana* в Азии, но отсутствует в Северной Америке [12, 14].

Несмотря на то, что 24 вида и 55 разновидностей таксона можно различить по морфологическим признакам, данная классификация остается спорной. Более консервативный систематический подход признает только 7–11 видов, которые выделяются по географическим границам: *T. baccata*, *T. brevifolia*, *T. canadensis* Marshall., *T. chinensis* Rehd., *T. cuspidata* Siebold. et Zucc. ex Endl., *T. floridana* Nutt. ex Chapm., *T. fauna* Nan Li & RR Mill, *T. globosa* Schltdl., *T. mairei* S.Y.Hu, *T. sumatrana* de Laub. и *T. wallichiana* Zucc. [12–15].

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ *Taxus* spp.

Из разных видов тиса было выделено более 500 таксоидов (таксанов) — дитерпеноидных соединений специфичного строения, а также “таксиновые алкалоиды”, флавоноиды и лигнаны. Основными вторичными метаболитами *Taxus* spp. являются таксаны. Наиболее знаменитым соединением этой группы считается паклитаксел, который был впервые выделен из коры *T. brevifolia* в 1971 г. [10].

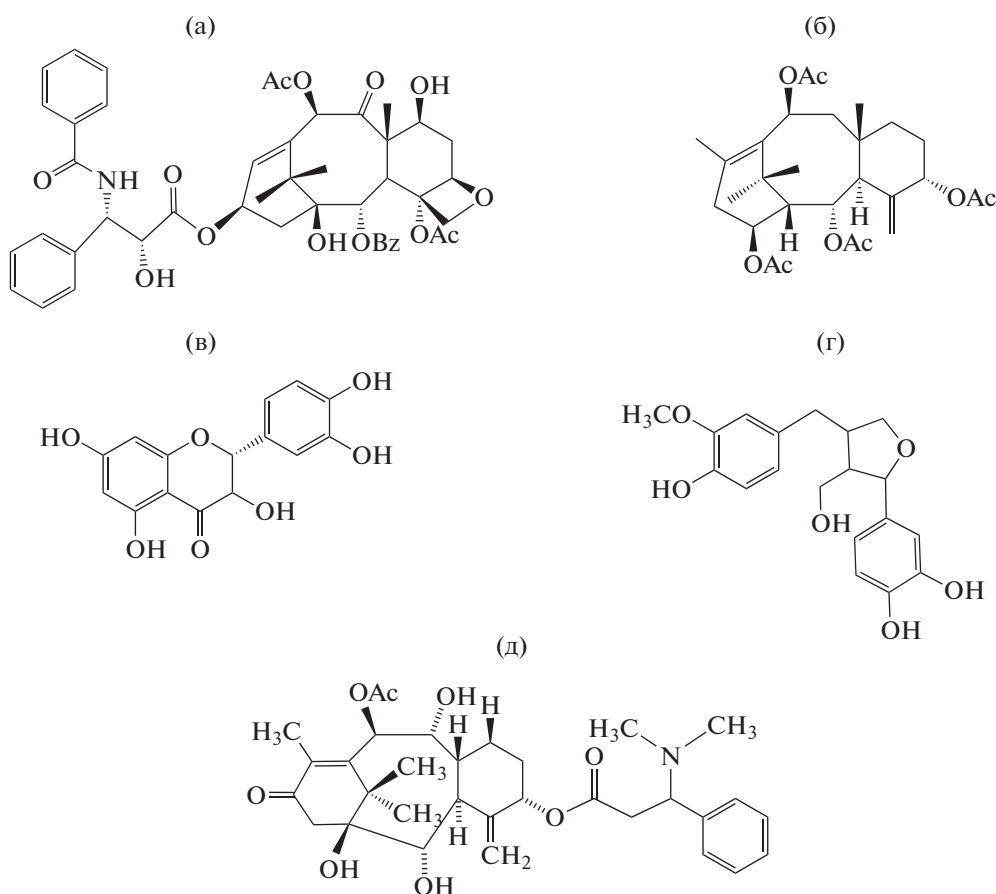


Рис. 1. Химические структуры вторичных метаболитов растений *Taxus* spp.: (а) — паклитаксел (С13-гидроксированный таксоид) [10]; (б) — таксуюннанин С (С14-гидроксированный таксоид) [10]; (в) — таксифолин (флавоноид) [20]; (г) — таксирезинол (лигнан) [17]; (д) — таксин В (таксиновый алкалоид) [22].

Таксоиды (таксаны)

Классификация таксанов включает 11 типов соединений и основана на расположении их кольцевых систем. Обычные таксаны 6/8/6 (цифры указывают размер каждого кольца) имеют линейную трициклическую кольцевую систему. Другие трициклические кольцевые системы обнаружены в 11(15→1)-абеотаксанах (5/7/6), 11(15→1), (10→9)-диабеотаксанах (5/6/6) и 2(3→20)-абеотаксанах (6/10/6). Тетрациклические кольцевые системы характерны для 3,11-циклотаксанов (6/5/5/6) и 14,20-циклотаксанов (6/8/6/6). 3,11:12,20-дициклотаксаны (6/5/5/5/6) и 3,11:4,12-дициклотаксаны (6/5/5/4/6) имеют пентациклические скелеты. Гексациклическая кольцевая система содержится в 3,11:4,12:14,20-трициклотаксанах (5/5/4/6/6/6). Бициклические кольцевые системы являются типичными для 3,8-секотаксанов (6/12) и 11,12-секотаксанов (8/6) [10, 16].

Метаболиты с кольцевой системой 6/8/6 (номенклатура основана на количестве атомов углерода в кольцах А, В и С) представляют собой наи-

более распространенный класс таксанов и имеют 349 известных структур, встречающихся в роде *Taxus*. Обыкновенные таксаны 6/8/6 подразделяются на 12 подгрупп в зависимости от функциональных групп, присоединенных к таксановому ядру. Большинство 6/8/6-таксанов (11 подгрупп) оксигенированы или гидроксированы в С-13 положении, только одна подгруппа включает таксоиды, оксигенированные по С-14 (эти соединения не имеют функциональной группы в положении С-13). Паклитаксел относится к 6/8/6-таксанам с оксетановым кольцом и фенилизосериновой боковой цепью в С13-положении (рис. 1). Метаболиты с кольцевой системой 5/7/6 (11(15→1)-абеотаксаны) представляют собой еще один многочисленный класс таксанов, для представителей рода *Taxus* известно около 127 структур [10, 16].

6/8/6-таксаны и 11(15→1)-абеотаксаны были обнаружены у всех исследованных видов тиса. 2(3→20)-абеотаксаны встречаются у всех видов рода *Taxus*, кроме трех: пока не обнаружены у *T. brevifolia*, *T. chinensis* и *T. wallichiana*. Секотаксаны были охарактеризованы у *T. canadensis*, *T. chinensis*

sis, *T. cuspidata*, *T. mairei* и *T. sumatrana*. Циклотаксаны обнаружены в *T. baccata*, *T. canadensis*, *T. cuspidata* и *T. yunnanensis* Cheng et L.K.Fu. Диабетаксаны выделены только из трех видов тиса: *T. sumatrana*, *T. wallichiana* и *T. yunnanensis* [10, 16].

Предполагается, что классы таксанов с небольшим числом представителей, как правило, встречаются у меньшего числа видов рода *Taxus*. Кроме того, низкие концентрации некоторых классов таксанов могут быть еще одной причиной того факта, что они не были обнаружены у большинства видов тиса [10, 16].

Формирование дитерпеноидного скелета таксоидов начинается с образования изопентенилдифосфата и диметилаллилдифосфата в пластах по 2-С-метил-D-эритритол-фосфатному пути (МЕР-пути). Путем циклизации геранилгеранилдифосфата таксациенсинтазой образуется таксациен (основная структура таксанового кольца). В дальнейшем таксановое кольцо проходит через ряд окислительных модификаций, реакций ацетилирования и гидроксирования, превращаясь в полноценное соединение. Путь биосинтеза таксола и подобных ему таксоидов имеет приблизительно 19–20 стадий и в нем участвуют порядка 16 ферментов [9].

Фенольные соединения

В *Taxus* spp. содержится целый ряд лигнанов. Из тисов выделено около 50 соединений этого класса, включая неолигнаны и несколько терпенолигнанов. В частности, в *T. wallichiana* были обнаружены изолиовил, конидендрин, матаирезинол, таксирезинол, (–)-секоизоларицирезинол, изотаксирезинол, (–)-7'-О-метилтанеол, формозанол, (+)-тсугацеталь, α-интермедианол, оксациклоокталигнан, ланцеолатанин. Пять лигнанов, которые являются димерными фенилпропаноидами, были идентифицированы у *T. baccata*: ларицирезинол, 3'-деметилизоларицирезинол-9'-гидроксиизопропиловый эфир, таксирезинол и 3-деметилизоларицирезинол (рис. 1) [17, 18].

В разных видах тиса также встречается целый спектр флавоноидов. В растениях *Taxus* spp. обнаружены сциадопитизин, аментофлавоин, гинкгетин, лютеолин, таксифолин, апигенин, изорамнетин, робустафлавоин и др. У разных видов тиса ветви и листья представляют большой интерес из-за наличия в них значительных количеств изокверцитрина, кверцитрина, билобетина и сциадопитизина [19]. Четырнадцать флавоноидов были идентифицированы с поверхности игл *T. baccata*, среди них доминировали 3-О-рутинозид мирицетин, 3-О-рутинозид кверцетин и кверцетин. Непосредственно из хвои *T. baccata* были выделены 3-О-рутинозиды кверцетина, 7-О-глюкозиды кемпферола и кверцетина, мирицетин, кверцитин и кемпферол (рис. 1) [20, 21].

Таксины (“таксиновые алкалоиды”)

Все части растений *Taxus* spp., за исключением ариллуса, ядовиты как в свежем, так и в высушенном виде, из-за наличия в них “таксиновых алкалоидов” — таксинов. По современной классификации таксины являются псевдоалкалоидами, так как представляют собой соединения, образованные из безазотистых полигидроксильных дитерпенов (таксидинов) этерифицированных с β-диметиламино-β-фенилпропионовой и уксусной кислотами. Существуют две основные группы таксинов: группа таксина А и группа таксина В. Структурный аналог таксина А, 2-деацетилтаксин А, был выделен из листьев *T. baccata* в 1994 г. Предварительная структура таксина В была впервые описана в 1986 г., но молекулярные и структурные формулы не были выяснены до 1991 г. Изотаксин В, структурный изомер таксина В, присутствует в качестве основного компонента в алкалоидных фракциях разных видов тиса (рис. 1) [22].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *Taxus* spp.

Биологическая активность таксоидов

Паклитаксел (таксол) является противоопухолевым препаратом, оказывающим влияние на стабилизацию микротрубочек, и представляет собой широко используемое химиотерапевтическое средство при многочисленных видах рака. Механизмы действия таксола, связанные с ингибированием роста опухоли, могут действовать на разных уровнях — он инициирует каскад сигнальных путей, приводящих к запрограммированной гибели клеток; может регулировать экспрессию определенных микроРНК, связанных с прогрессированием рака; оказывает множество положительных влияний на модуляцию иммунного ответа посредством регуляции хемокинов, цитокинов или иммунных клеток [5]. В отличие от других тубулин-связывающих противоопухолевых препаратов, которые предотвращают сборку тубулина в микротрубочки, паклитаксел способствует сборке тубулина в микротрубочки и предотвращает их диссоциацию, что приводит к стабилизации микротрубочек на G2-М этапе клеточного цикла, блокируется их деполимеризация в растворимый тубулин и происходит подавление пролиферации клеток [23].

Паклитаксел был открыт в 1971 г. и после серии клинических испытаний Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило его для лечения запущенного рака яичников в 1992 г. С тех пор таксол широко применяется в химиотерапии рака молочной железы, колоректального рака и плоскоклеточного рака мочевого пузыря. Кроме того, он был использован при

лечении таких заболеваний, как рак головы и шеи, мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легких и саркомы Капоши, ассоциированной со СПИДом [23].

В настоящее время, помимо таксола, существует ряд его полусинтетических вариантов, а именно доцетаксел и кабазитаксел, которые также широко используются в качестве химиотерапевтических средств [24].

Биологическая активность фенольных соединений

Лигнаны тиса обладают противоопухолевым потенциалом. Таксирезинол, выделенный из *T. wallichiana*, проявлял подобную активность в отношении рака яичников, толстой кишки, молочной железы и печени в системе *in vitro*. Три лигнана (секоизоларицирезинол, таксирезинол и изотаксирезинол), выделенные в качестве основных компонентов из древесины *T. yunnanensis*, были оценены на их антипролиферативную активность в отношении клеточных линий рака толстой кишки мыши и фибросаркомы человека, среди протестированных соединений наибольшая активность наблюдалась у секоизоларицирезинола в случае с фибросаркомой [17].

Было показано, что изотаксирезинол и секоизоларицирезинол из древесины *T. yunnanensis*, обладают мощной активностью по удалению радикалов DPPH и значительным ингибирующим действием в отношении продукции оксида азота. Оба лигнана предотвращают повреждение печени, вызванное D-галактозамином/липополисахаридом, путем ингибирования апоптоза гепатоцитов через блокирование TNF- α и выработку IFN- γ [17].

Изотаксирезинол, секоизоларицирезинол и таксирезинол были протестированы на их гипогликемическое действие. В дозе 100 мг/кг (внутривенно) изотаксирезинол снижал уровень глюкозы в крови натошак у крыс с диабетом на 34.5%, в то время как секоизоларицирезинол и таксирезинол снижали его на 33.4% и 20.9%, соответственно. Лигнаны *T. baccata* проявляли умеренное ингибирование бутирилхолинэстеразы и липоксигеназы, которые играют роль в патогенезе болезни Альцгеймера [17].

Высокая антирадикальная активность была продемонстрирована для флавоноидов из *T. wallichiana*, *T. cuspidata*, *T. baccata*. Хвоя *T. baccata* оказывает гепатопротекторную, транквилизирующую и седативную активности, что предположительно связано с бензодиазепиноподобным действием обнаруженных в ней флавоноидов. Сциадопитизин демонстрировал нейропротекцию против повреждений в первичных кортикальных нейронах, вызванных A β -белком [20, 21, 25–27].

Биологическая активность “таксиновых алкалоидов”

Изменения сердечной деятельности после интоксикации тисом приписывают главным образом действию “таксиновых алкалоидов”, влияющих на проницаемость натрия и кальция в клетках миокарда (блокируют натриевые и кальциевые каналы). Таксины нарушают натрий-калиевый транспорт и приводят к увеличению цитоплазматического кальция в клетках, что стимулирует возникновение и прогрессирование опасной для жизни формы аритмии. Сначала наблюдается появление головокружения, мириаза, тошноты, рвоты, боли в животе, тахикардии и судорог, за которыми следуют брадикардия, паралич, диастолическая остановка сердца и смерть [28]. Таксиновые алкалоиды всасываются через пищеварительный тракт очень быстро, и признаки отравления проявляются через 30–90 минут [29]. При введении таксина В как *in vivo*, так и *in vitro* было показано, что он более кардиотоксичен, чем таксин А. Механизм действия таксина В напоминает антиаритмические препараты класса I, такие как флекаинид, прокаинамид и хинидин [22].

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *Taxus* spp. И СПЕЦИФИКА ОБРАЗОВАНИЯ В НИХ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Получение культур клеток Taxus spp.

Для получения культур клеток высших растений наиболее сложными объектами являются хвойные деревья. Для *Taxus* spp. ситуация осложняется высокой вероятностью наличия в эксплантах значительного количества вторичных метаболитов, многие из которых достаточно токсичны [30].

Каллусная культура клеток тиса (*T. baccata*) впервые была получена в 1973 г. В дальнейшие годы многие исследователи проводили работы по оптимизации условий каллусогенеза и выращивания полученных культур клеток разных видов тиса, при этом особое внимание обращали на выбор экспланта, методов его стерилизации, оптимизации состава сред и условий культивирования [1, 4, 31].

В ряде работ была обнаружена зависимость частоты и эффективности каллусообразования от фенологического состояния донорного растения, при этом были получены неоднозначные результаты. В одном случае максимальная частота каллусогенеза при использовании в качестве экспланта хвои *T. baccata* и *T. canadensis* была отмечена для растительного материала, собранного в июле — августе, тогда как при использовании хвои, собранной весной (март — апрель) и осенью (сентябрь — ноябрь), частота каллусообразования снижалась в три раза, а время до начала формирования каллуса увеличивалось в два раза [31]. В дру-

гом исследовании лучшие результаты были получены с “зимними” эксплантами (январь), по сравнению с летними (июль). Авторы связывают зависимость эффективности каллусообразования от фенологического состояния донорного растения с различным уровнем содержания фенольных соединений в эксплантах — в “зимней” хвое их существенно меньше [32].

Многие авторы отмечают, что “потемнение” каллусов, вызванное образованием значительного количества фенольных соединений при получении культур клеток тиса наблюдается достаточно часто [33]. Это может приводить к гибели клеток, и требует специальных мер для предотвращения данного процесса.

В ряде работ для инактивации свободных фенолов и улучшения роста каллусов в питательную среду добавляли антиоксиданты — аскорбиновую кислоту (10–100 мг/л) или поливинилпирролидон (0.1–0.5%), а также сорбенты — активированный уголь (0.1–1.0%). Результаты экспериментов с несколькими видами тиса показали, что добавление поливинилпирролидона препятствовало потемнению питательной среды, но лишь незначительно уменьшило некротизацию каллуса; введение в среду активированного угля в 3–4 раза уменьшало степень некротизации каллуса по сравнению с контролем, но в 7 раз снижало частоту каллусообразования; добавление аскорбиновой кислоты в 2 раза уменьшило некротизацию экспланта и первичного каллуса и увеличило скорость роста каллуса [31].

Наиболее важными компонентами питательной среды, определяющими каллусогенез, являются фитогормоны. Во многих работах проводили исследования влияния гормонального состава сред на частоту каллусообразования. В частности, для хвои *T. baccata* используемой в качестве экспланта наибольшая эффективность каллусогенеза отмечена на среде Гамборга с добавлением 2 мг/л 2,4-Д и на среде Весткотта для хвойных растений с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (α -НУК, 4 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) [31]. Однако из анализа доступных источников, можно заключить, что оптимального гормонального состава среды для каллусогенеза *Taxus* spp. не определено; для каждого случая желателен его индивидуальный подбор.

Суспензионные культуры клеток *Taxus* spp. в основном получают путем переноса первичного каллуса в жидкую питательную среду, при этом они состоят преимущественно из мелких агрегатов клеток. В ряде работ отмечается высокая степень изменчивости по параметрам роста и физиологическим характеристикам суспензионных культур клеток, полученных из каллусных культур, а также из однотипных эксплантов растений разных видов [1, 4, 8].

Оптимизация выращивания культур клеток *Taxus* spp.

Эффективность процессов культивирования *in vitro* в значительной степени определяется правильным выбором питательной среды [30]. Как для каллусных, так и для суспензионных культур клеток различных видов рода *Taxus*, в большинстве работ не было на первом этапе получено высокопродуктивных линий, которые можно было бы использовать сразу для промышленной продукции паклитаксела. Ранние исследования показали, что клетки *Taxus* spp. *in vitro* могут синтезировать таксол и подобные ему таксоиды при оптимизированных условиях. В каллусной культуре *T. baccata*, который был выращен на среде Мурасиге и Скуга с различными регуляторами роста, было выявлено восемь аналогов паклитаксела [1, 2, 8].

Стандартным приемом повышения продуктивности культур клеток является отбор линий, характеризующихся высоким содержанием таксола. Основной проблемой при использовании этого подхода для культур клеток тиса является медленный прирост биомассы. По данным ряда авторов, удвоение биомассы культур клеток *T. brevifolia* и *T. cuspidata* происходит к 14–20 сут., что в 5–6 раз ниже, по сравнению с большинством других культур клеток [8, 34].

Существенное влияние на рост и биосинтез целевых соединений в культурах клеток оказывает состав углеводов в питательной среде. В ряде исследований изучали эффект концентрации углеводов на формирование таксоидов в клетках *in vitro* *Taxus* spp. В результате работ было получено содержание таксола на уровне 0.02% на сухой вес клеток, что вполне сопоставимо с концентрацией этого соединения в коре интактных растений. Отмечено, что различные углеводы по-разному влияют на синтез паклитаксела в культуре клеток тиса, который усиливается при использовании фруктозы и подавляется глюкозой [1, 8].

В результате многочисленных исследований, в ряде лабораторий получены каллусные и суспензионные культуры клеток различных видов *Taxus* с удовлетворительными ростовыми характеристиками [35]. Эффективные в отношении продукции различных таксоидов культуры клеток тиса получены из растений видов: *T. baccata*, *T. media* (гибрид *T. baccata* и *T. cuspidata*), *T. cuspidata*, *T. brevifolia*, *T. chinensis*, *T. globosa*, *T. wallichiana* [1, 4, 8, 36, 37].

Следует отметить, что культурам клеток *Taxus* spp. принадлежит своеобразный рекорд, достойный книги рекордов Гиннеса — несколько хорошо растущих культур были получены от растения *T. baccata*, произрастающего в Никитском ботаническом саду (Республика Крым), возраст которого оценивается не менее 800 лет (по мнению ряда экспертов — около 1000 лет). Исходя из доступных источников, можно утверждать, что к



Рис. 2. 800-летнее дерево *T. baccata* (Никитский ботанический сад) (а) и процесс каллусогенеза на его эксплантах (б).

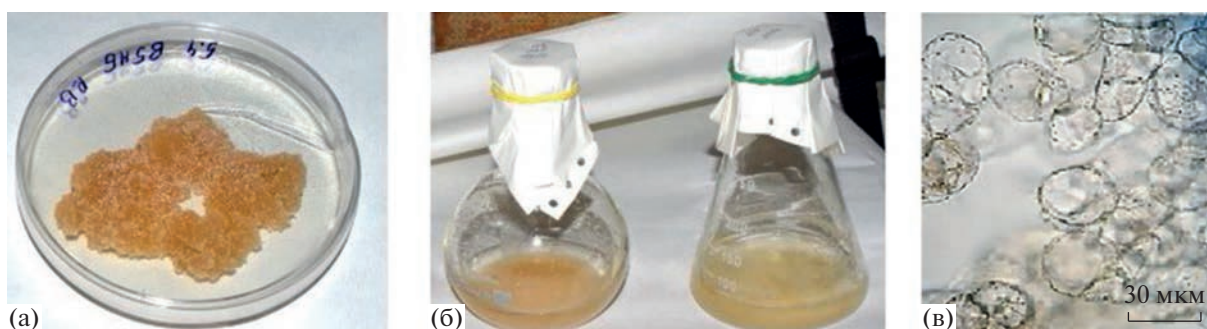


Рис. 3. Каллусная (а), суспензионная (б) культуры *T. baccata* и микрофотография клеток тиса (в) в суспензии.

настоящему времени это самый большой возраст растения, из которого были получены культуры клеток (рис. 2, 3) [38].

Образование таксоидов в культурах клеток *Taxus spp.*

Подавляющее количество работ посвящены изучению культур клеток разных видов *Taxus* с целью изучения образования в них таксоидов. Чаще в работах используют каллусные культуры клеток, для которых осуществляют поиск и идентификацию в основном паклитаксела. В литературе есть сообщения о получении культур клеток, содержащих таксол в количествах, сопоставимых с его содержанием в интактных растениях, однако в большинстве случаев авторы отмечают его отсутствие или наличие в следовых количествах [2, 4, 35, 36]. В суспензионной культуре паклитаксел был впервые обнаружен в 1989 г. (культура клеток *T. brevifolia*) [39].

Следует сказать, что большинство работ направлено на исследование образования в культу-

рах клеток практически значимых С13 — гидроксированных таксоидов — паклитаксела и баккатина III, тогда как образование С14-гидроксированных таксоидов в культурах клеток изучено гораздо слабее. Тем не менее, имеющиеся результаты свидетельствуют, что в культурах клеток тиса, как правило, образуется именно эта группа соединений, и их качественный состав и количественное содержание существенно выше, по сравнению с 13-ОН-производными [40]. Считается, что в интактных растениях *Taxus spp.* преимущественно накапливаются 13-гидроксированные таксоиды, однако при этом необходимо отметить существенные различия содержания разных групп таксанов в разных органах растения [10, 16].

Необходимо отметить, что токсичность 14-гидроксированных соединений существенно ниже, по сравнению с 13-ОН-производными, и это может быть важным фактором, определяющих их преимущественное образование в пролиферирующих дедифференцированных растительных клетках *in vitro* [41].

*Способы интенсификации образования
фармацевтически ценных таксоидов
в культурах клеток Taxus spp.*

Влияние сигнальных веществ (фитогормоны, регуляторы роста, элиситоры). Одним из хорошо изученных стимуляторов образования паклитаксела в культурах клеток *Taxus* spp. является фитогормон метилжасмонат (MeJA), который во многих работах не совсем корректно относят к группе элиситоров [4]. MeJA был впервые использован при работах с культурами клеток *T. baccata* в 1996 г., в результате которых было обнаружено, что он может усилить синтез таксоидов более чем в 120 раз. Метилжасмонат применяли для увеличения продукции паклитаксела в клеточных культурах *T. baccata*, *T. canadensis* и *T. cuspidata* [36, 42–44].

В каллусной культуре *T. cuspidata* после стимуляции 100 мкМ MeJA, появлялись пять таксоидов (цефаломанин, 1 β -дегидроксибаккатин VI, таксинин NN-11, баккатин I, 2 α -ацетокситаксузин), а также один абиетан — таксамаирин С, в дополнение к уже имеющимся там соединениям, таким как паклитаксел, 7-эпи-таксол, таксол С, баккатин VI, таксаюнтин С, таксуюннанин С и его аналоги, юннанксан и таксамаирин А. Эти результаты показывают, что MeJA может изменять качественный состав таксоидов, влияя на определенные пути синтеза соединений в растительных клетках *in vitro* [45].

Эффект MeJA может усиливаться в комбинации с другими стимуляторами биосинтеза вторичных метаболитов. Комбинация из хитозана, MeJA и Ag⁺ приводила к увеличению продукции паклитаксела в суспензионной культуре *T. chinensis*, которая была почти в 40 раз выше, чем у контрольной культуры (без добавления элиситоров), в 10 раз выше, чем у культуры, подвергшейся воздействию только Ag⁺, в 6 раз выше, чем у культуры с добавлением только хитозана, и в 2 раза выше, чем у культуры с добавлением только MeJA [46]. Элиситор из гриба *Rhizopus stolonifera*, использованный в сочетании с метилжасмонатом и салициловой кислотой, повышает производство паклитаксела в 16 раз при добавлении на 25–30 день выращивания суспензионной культуры клеток *T. baccata* [47].

Конечная концентрация MeJA в среде имеет ключевое значение для стимуляции биосинтеза. Было показано, что MeJA в концентрации 200 мкМ стимулирует синтез паклитаксела и баккатина III в культуре клеток *T. baccata* менее эффективно, чем в концентрации 100 мкМ [48].

Есть данные об использовании коронатина — токсина, вырабатываемого патогеном *Pseudomonas syringae*. Общая максимальная концентрация таксоидов в суспензионной культуре *T. media* при воздействии коронатина составляла 77.46 мг/л и увеличилась даже больше, чем при добавлении метилжасмоната (21.48 мг/л), при этом в кон-

трольных условиях она была на уровне 8.14 мг/л [49]. Любопытно, что конфигурация молекулы коронатина “мимикрирует” строение конъюгата жасмонатов с изолейцином и токсичность коронатина во многом обусловлена его “жасмонато-подобным” действием на растения.

В каллусной культуре *T. cuspidata* концентрация паклитаксела увеличивалась с 89 мкг/г до 139 мкг/г сухой массы после добавления хитозана — компонента клеточных стенок некоторых грибов [50]. Продукция таксола в суспензионной культуре клеток *T. baccata* повышалась примерно в три раза при добавлении в питательные среды комплекса аминокислот в сочетании с хитозаном [51].

Для интенсификации образования таксоидов в ряде работ используют ванадилсульфат, нитрат серебра, хлорид кобальта, арахидоновую кислоту, цитрат аммония, салициловую кислоту и полисахариды бактериального и грибного происхождения, как по отдельности, так и в комбинации [36].

Показано изменение содержания таксанов в суспензионной культуре *T. media* при использовании перфтордекалина (фторуглерод, в котором все атомы водорода заменены атомами фтора) и гексенола (природное летучее органическое соединение, вырабатываемое в поврежденных зеленых тканях, которое участвует в защитных взаимодействиях между растениями) по отдельности и в сочетании с коронатином и β -циклодекстринами. Общее содержание таксоидов в клеточных культурах *T. media*, обработанных перфтордекалином совместно с коронатином и β -циклодекстринами повышалось в 3.3 раза. Гексенол в суспензии *T. media* блокировал формирование таксола, но усиливал производство баккатина III [52].

Для оценки влияния сигнальных веществ (метилжасмонат, этанол, бутионин сульфоксмин, пероксид водорода) на продукцию таксоидов была исследована суспензионная культура клеток *T. globosa*. Использование комбинации из бутионин сульфоксмина и пероксида водорода приводило к значительному увеличению концентрации 10-деацетилбаккатина (1662 мкг/г сухого веса), цефаломанина (334.32 мкг/г сухого веса) и таксола (157 мкг/г сухого веса) [53].

Эффективность стимуляции синтеза фармацевтически ценных таксоидов под влиянием сигнальных веществ в различных суспензионных культурах клеток *Taxus* spp. представлена в табл. 1.

Предшественники синтеза. Большое внимание во многих работах было уделено исследованиям действия предшественников синтеза, сахаров и ингибиторов роста на накопление паклитаксела в культурах клеток тиса. Синтез деацетилбаккатина III, баккатина III или паклитаксела в культуре клеток *T. wallichiana* усиливался при добавлении фенилаланина, бензоата натрия, гиппуровой кислоты и лейцина. Ингибиторы роста, такие как

Таблица 1. Элиситация суспензионных культур клеток *Taxus* spp.

Вид тиса	Вариант элиситации	Продуктивность по таксоидам	Литературный источник
<i>T. baccata</i>	Метилжасмонат	Паклитаксел – 48.3 мг/л Баккатин III – 53.6 мг/л Цефаломанин – 3.6 мг/л	[4]
	Метилжасмонат, салициловая кислота, элиситор из <i>Rhizopus stolonifera</i>	Таксол – 39.5 мг/л	[47]
	Комплекс аминокислот, хитозан	Таксол – 1.96 мг/г сухого веса	[51]
<i>T. canadensis</i>	Метилжасмонат, этилен	Сумма таксоидов (10-деацетилбаккатин III, баккатин III, 10-деацетилтаксол, паклитаксел) – 25.3 мг/л	[43]
<i>T. cuspidata</i>	Метилжасмонат, этилен	Таксол – 3.4 мг/л	[44]
<i>T. chinensis</i>	Хитозан, метилжасмонат, Ag ⁺	Паклитаксел – 25 мг/л	[46]
<i>T. media</i>	Коронатин	Сумма таксоидов (10-деацетилбаккатин III, баккатин III, цефаломанин, 10-деацетилтаксол, паклитаксел) – 77.46 мг/л	[49]
	Перфтордекалин, коронатин, β-циклодекстрины	Сумма таксоидов (баккатин III, цефаломанин, 10-деацетилтаксол, таксол) – 9.4 мг/л	[52]
<i>T. globosa</i>	Бутионин сульфоксимин, пероксид водорода	10-деацетилбаккатин – 1662 мкг/г сухого веса Цефаломанин – 334.32 мкг/г сухого веса Таксол – 157 мкг/г сухого веса	[53]

2-хлорэтилфосфоновая кислота и хлорохалин хлорид были полезны для получения паклитаксела и деацетилбаккатина III в культуре клеток *T. wallischiana*. Подобные эффекты могут быть связаны с влиянием предшественников синтеза и ингибиторов роста на 2α-бензоилтрансферазу, 10-О-ацетилтрансферазу, фенилпропаноилтрансферазу и 3-N-дебензоил-2-дезокситаксол-N-бензоилтрансферазу и различной реакцией этих ферментов на внешние стимулы [54]. Было зафиксировано увеличение содержания паклитаксела в культуре клеток *T. cuspidata* после введения фенилаланина, бензойной кислоты и N-бензоилглицина, которые являются предшественниками боковой цепи целевого соединения. Высший уровень продукции таксола у культуры клеток *T. chinensis* был получен путем периодического введения 3%, 1% и 2% сахарозы в начале, на 7 и 21 сут. цикла выращивания, соответственно [1].

Физические факторы культивирования. Изучено влияние ряда физических факторов культивирования на формирование таксоидов в культурах клеток *Taxus* spp. (состав газовой смеси, осмотический стресс, температура) [1]. Было отмечено, что соотношение 10% кислорода:0.5% диоксида углерода:5 ppm этилена являются наиболее оптимальным составом газовой смеси для производства паклитаксела из суспензионной культуры клеток *T. cuspidata* [55, 56]. Влияние осмотическо-

го стресса на производство таксола исследовали в суспензионной культуре *T. chinensis*. Оптимальное накопление паклитаксела было достигнуто при начальной концентрации сахарозы 60 г/л. При этом даже осмотическое давление, создаваемое маннитом, сорбитом, полиэтиленгликолем, усиливало образование целевого соединения [1, 57]. На биосинтез таксоидов в культуре клеток тиса влияло изменение температуры во время культивирования. При повышении температуры с 24°C до 29°C на 21 сут. культивирования суспензионной культуры клеток *T. chinensis*, происходило увеличение выхода паклитаксела до 137.5 мг/л (исходное содержание целевого соединения в культуре было на уровне 49.6 мг/л). Напротив, концентрация таксуюннанина С снижалась при изменении температуры с 24°C на 29°C в пределах от 885.9 до 512.9 мг/л, соответственно [58].

Иммобилизация клеток, различные системы культивирования и биотрансформация. Иммобилизация в некоторых случаях является одним из полезных подходов для увеличения образования вторичных метаболитов в растительных клетках *in vitro*. Альгинат кальция использовали для иммобилизации клеток *T. baccata* и отметили трехкратное увеличение выработки паклитаксела [1, 4].

Как и для многих вторичных метаболитов, интенсивное образование таксола в культурах клеток, как правило, происходит в фазе замедления

роста и стационарной фазе. Двухступенчатая система культивирования, в которой растительные клетки сначала выращивают для получения биомассы, а затем переносят в питательную среду, благоприятную для получения таксанов, является эффективной стратегией увеличения производства целевых соединений. Дополнительное преимущество состоит в том, что подобный способ культивирования позволяет добавлять предшественники синтеза и элиситоры, когда выработка вторичных метаболитов находится на максимально высоком уровне. Эта стратегия была успешно использована для улучшения продукции паклитаксела и баккатина III в суспензионных культурах *T. baccata* [1, 4].

Небольшие количества вторичных метаболитов, выделяющиеся в питательную среду, могут приводить к различным нарушениям биосинтеза целевых веществ. Формирование места для накопления фитохимических соединений в виде второй фазы (органический растворитель или твердое соединение) позволяет получить более высокие концентрации фармацевтически ценных субстанций. Удаление продуктов вторичного метаболизма из водной среды *in situ* с использованием двухфазной системы культивирования облегчает их высвобождение из внутриклеточных органелл. Для культур *in vitro* *Taxus* spp. было обнаружено, что накопление таксола в клетках вызывает нарушения в регуляции синтеза целевого соединения и приводит к деградации продукта, поэтому, его извлечение из суспензионных культур имеет важное значение для повышения их продуктивности. Высвобождение таксола и баккатина III из клеток в среду было усилено на 120 и 97%, соответственно, в присутствии сульфата ванадия. Двухфазная система культивирования была успешно применена для культур клеток *T. brevifolia* и *T. cuspidata* [1, 4].

Стоит также сказать, что большой интерес представляют исследования процессов биотрансформации соединений таксанового ряда, поскольку эти реакции могут осуществляться с использованием бактерий, грибов, растительных клеток *in vitro* и даже выделенными ферментами, а это может быть перспективно для получения конкретных целевых веществ [59].

Промышленное выращивание культур клеток Taxus spp.

К настоящему времени коммерческое получение таксола в промышленных биореакторах организовано в ряде стран — Phyton Biotech (Германия), ESCA genetics (Калифорния, США), Phyton (Нью-Йорк, США) и Samyang Biopharm (Республика Корея) [4, 11, 36].

Компания Phyton Catalytic (сейчас — Phyton Biotech, принадлежащий DFB Pharmaceuticals) начала

масштабирование суспензионных культур клеток *Taxus chinensis* в начале 1990 г. с целью запуска крупномасштабного производства паклитаксела (Taxol®). В настоящее время компания Phyton Biotech (Германия) является крупнейшим производителем таксола с использованием культуры клеток *T. chinensis*, которую выращивают в ферментерах объемом до 75000 л [2]. Технология ферментации растительных клеток была лицензирована для Bristol Myers Squibb в 1995 г. В 2004 г. компания Bristol Myers Squibb выиграла престижный Президентский конкурс “Зеленая химия” Американского химического общества, вследствие перехода в 2002 г. на выращивание культуры клеток растений в качестве единственного источника для своего противоракового препарата Taxol® [11].

Патентная защита для Taxol® истекла в 2000 г., что стимулировало конкуренцию среди производителей, в том числе исследование новых культур клеток тиса, а также процессов разработки и усовершенствования методов получения паклитаксела и родственных ему таксанов. На сегодняшний день коммерческое выращивание культур клеток *Taxus* spp. реализовано в США (ESCA genetics) и Южной Корее (Samyang Biopharm). Компания Samyang Biopharm использует культуры клеток *Taxus* в ферментерах объемом 35000 л для производства паклитаксела под торговым названием Genexol® [11].

Однако точные сведения о коммерческом производстве таксоидов, в том числе с использованием культур клеток, как правило, в открытом доступе отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Природный дитерпеноид паклитаксел является одним из самых эффективных противоопухолевых препаратов (Taxol®) со специфическим механизмом действия. Традиционным источником таксола считается кора растений *Taxus* spp., но его низкое содержание (~0.02% от сухого веса), сложность выделения и очистки определяет высокую стоимость конечного продукта. Принципиально важно, что использование для получения таксола дикорастущих деревьев создает реальную угрозу их исчезновения. Растущий спрос на паклитаксел и его производные в условиях дефицита растительных ресурсов для их получения, сделал соединения таксанового ряда одним из наиболее важных объектов для разработки альтернативных способов их получения и производства, в том числе биотехнологических [1, 2].

В настоящее время рассматриваются три стратегии решения этой проблемы: полный химический синтез или “полусинтез” целевых соединений; поиск альтернативных источников сырья и использование методов генетической или метаболической

инженерии (создание трансгенных организмов с введенными генами биосинтеза таксоидов).

Полный синтез и полусинтез паклитаксела, как правило, коммерчески невыгоден из-за слишком большой химической сложности целевого соединения.

Создание трансгенных организмов (бактерий, дрожжей) может оказаться достаточно эффективным способом получения таксоидов, однако в настоящее время, когда еще не известны детали их биосинтеза, о его перспективах говорить преждевременно. Значительный интерес представляет получение трансгенных по ключевым генам биосинтеза культур клеток или культур трансформированных корней (*hairy roots*) — однако эти системы, скорее всего, имеет смысл относить к альтернативным источникам растительного сырья.

К альтернативным источникам сырья можно отнести плантационные посадки, использование эндофитных грибов тиса, а также культуры клеток и культуры органов (трансформированных или адвентивных корней) *in vitro* *Taxus* spp. Основным недостатком плантационного выращивания деревьев тиса является его длительность (десяtkи лет). Несмотря на этот существенный минус данный способ активно реализуют в Китае.

Таким образом, к настоящему времени наиболее многообещающий и удобный подход к устойчивому производству таксола и подобных ему соединений — это промышленное выращивание культур клеток *Taxus* spp. [5, 8].

Культура клеток *in vitro* имеет много преимуществ: выращивание не подвержено влиянию погоды, времен года и загрязнению окружающей среды; этот способ позволяет непрерывно получать паклитаксел достаточной чистоты из постоянно возобновляемого высококачественного растительного сырья; можно контролировать накопление целевых веществ в культурах, а также увеличивать их продуктивность различными способами (оптимизация состава питательных сред, использование предшественников синтеза и элиситоров, двухстадийное и двухфазное культивирование, метаболическая и геновая инженерия). Однако существуют и трудности: медленный рост клеток; невысокая производительность по целевым метаболитам; высокие затраты на организацию подобного крупномасштабного биотехнологического производства [35].

При создании биотехнологического производства на основе культур клеток тиса основной проблемой является получение высокопродуктивного штамма-продуцента целевых продуктов — паклитаксела или других таксоидов. Для проведения подобных работ важно учитывать свойства культуры клеток как особой биологической системы — популяции соматических клеток со специфическими особенностями вторичного метаболизма. Для культур клеток *Taxus* spp. возможно именно этим обу-

словлено преимущественное образование C14-гидроксированных таксоидов.

К настоящему времени известен ряд биотехнологических производств на основе культур клеток тиса. В 1995 г. компания Phytion Biotech лицензировала процесс получения таксола из суспензионной культуры клеток *T. chinensis* для Bristol Myers Squibb. На сегодняшний день подобные технологии для производства паклитаксела и родственных ему таксанов используют на коммерческом уровне компании Phytion Biotech (Германия), ESCA genetics (Калифорния, США), Phytion (Нью-Йорк, США) и Samyang Biopharm (Республика Корея) [4, 11, 36].

Подводя итог вышесказанному, можно отметить, что таксаны — это одна из наиболее интересных и перспективных групп дитерпеноидов в отношении химиотерапии различных онкологий. Исследование механизмов их биологической активности, регуляции биосинтеза, в том числе на молекулярно-генетическом уровне, поиск новых альтернативных источников получения соединений и усовершенствование уже имеющихся технологий имеет как фундаментальную, так и значительную практическую значимость. Несмотря на то, что знания в этой области постоянно дополняются и расширяются, пока еще нет четких ответов на многие вопросы. Вероятно, что молекулярно-генетические достижения, связанные с изучением генов таксанового метаболизма и закономерностей их регуляции в интактном растении и культуре клеток *in vitro*, а также более полный фитохимический анализ растительных ресурсов и их биотехнологических аналогов позволят оптимизировать различные способы получения фармацевтически ценных таксоидов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (темы № 121050500047–5 и 121041200194–7).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murthy H.N., Dandin V.S., Joseph K.S., Park S.Y., Paek K.Y. Plant cell and organ culture as an alternative for the production of anticancer compounds // Anticancer plants: natural products and biotechnological implements / Eds. M. S. Akhtar, M. K. Swamy. Singapore: Springer Nature, 2018. P. 429. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8064-7_18
2. Exposito O., Bonfill M., Moyano E., Onrubia M., Mirjalili M.H., Cusido R.M., Palazon J. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects // Anticancer Agents Med. Chem. 2009. V. 9. P. 109. <https://doi.org/10.2174/187152009787047761>

3. Nimasow G., Nimasow O.D., Rawat J.S., Norbu L. Conservation efforts of an important medicinal plant (*Taxus baccata* Linn.) in West Kameng district of Arunachal Pradesh (India) // Earth Sci. 2015. V. 4. P. 1. <https://doi.org/10.11648/j.earth.s.2015040301.11>
4. Malik S., Cusido R.M., Mirjalili M.H., Moyano E., Palazon J., Bonfill M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review // Process Biochem. 2011. V. 46. P. 23. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.004>
5. Zhu L., Chen L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy // Cell. Mol. Biol. Lett. 2019. V. 24. P. 40. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0164-y>
6. Ismaiel A.A., Ahmed A.S., Hassan I.A., El-Sayed E.S.R., Karam El-Din A.Z.A. Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101. P. 5831. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8354-x>
7. Maheshwari P., Garg S., Kumar A. Taxoids: biosynthesis and *in vitro* production // Biotech. Mol. Biol. Rev. 2008. V. 3. P. 071.
8. McElroy C., Jennewein S. Taxol® biosynthesis and production: from forests to fermenters // Biotechnology of Natural Products / Eds. W. Schwab, B.M. Lange, M. Wust. Cham: Springer International Publishing. 2018. P. 145. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_7
9. Wang T., Li L., Zhuang W., Zhang F., Shu X., Wang N., Wang Z. Recent research progress in taxol biosynthetic pathway and acylation reactions mediated by *Taxus* acyltransferases // Molecules. 2021. V. 26. P. 2855. <https://doi.org/10.3390/molecules26102855>
10. Wang Y.F., Shi Q.W., Dong M., Kiyota H., Gu Y.C., Cong B. Natural taxanes: developments since 1828 // Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 7652. <https://doi.org/10.1021/cr100147u>
11. Wilson S.A., Roberts S.C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules // Plant Biotechnol. J. 2012. V. 10. P. 249. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x>
12. Spjut R.W. Taxonomy and nomenclature of *Taxus* (Taxaceae) // J. Bot. Res. Inst. Tex. 2007. V. 1. P. 203.
13. Hao D.C., Xiao P.G., Ge G.B., Liu M. Biological, chemical, and omics research of *Taxus* medicinal resources // Drug. Development Res. 2012. V. 73. P. 477. <https://doi.org/10.1002/ddr.21040>
14. Spjut R.W. A phytogeographical analysis of *Taxus* (Taxaceae) based on leaf anatomical characters // J. Bot. Res. Inst. Texas. 2007. V. 1. P. 291.
15. Li J., Davis C.C., Tredici P.D., Donoghue M.J. Phylogeny and biogeography of *Taxus* (Taxaceae) inferred from sequences of the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA // Harv. Pap. Bot. 2001. V. 6. P. 267.
16. Lange B.M., Conner C.F. Taxanes and taxoids of the genus *Taxus* – A comprehensive inventory of chemical diversity // Phytochem. 2021. V. 190. P. 112829. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112829>
17. Topcu G., Demirkiran O. Lignans from *Taxus* species // Top Heterocycl. Chem. 2007. V. 11. P. 103. https://doi.org/10.1007/7081_2007_082
18. Dang P.H., Nguyen H.X., Nguyen H.H.T., Vo T.D., Le T.H., Phan T.H.N., Nguyen M.T.T., Nguyen N.T. Lignans from the roots of *Taxus wallichiana* and their α -glucosidase inhibitory activities // J. Nat. Prod. 2017. V. 80. P. 1876. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00171>
19. Krauze-Baranowska M. Flavonoids from the genus *Taxus* // Z Naturforsch C J Biosci. 2004. V. 59. P. 43. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-1-210>
20. Bekhouche M., Benyammi R., Slaoui M.K., Krimat S., Paris C., Khelifi L., Morsli A. Flavonoid profile and antioxidant properties of Algerian common yew (*Taxus baccata* L.) // Clinical Phytosci. 2022. V. 8. P. 17. <https://doi.org/10.1186/s40816-022-00348-x>
21. Bekhouche M., Morsli A., Slaoui M.K., Benyammi R., Krimat S., Paris C., Khelifi L. Antioxidant properties of the needles of *Taxus baccata* L. growing in Algeria and characterization of their antioxidant constituents by LC–DAD–ESI–MSⁿ // J. Global Trends Pharm. Sci. 2021. V. 12. P. 9026.
22. Wilson C.R., Hooser S.B. Toxicity of yew (*Taxus* spp.) alkaloids // Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles / Ed. by R.C. Gupta. USA: Academic Press. 2018. P. 947. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00066-0>
23. Sinha D. A review on taxanes: an important group of anticancer compound obtained from *Taxus* sp. // IJPSR. 2020. V. 11. P. 1969. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11\(5\).1969-85](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).1969-85)
24. Nicolaou K.C., Valiulin R.A. Synthesis and biological evaluation of new paclitaxel analogs and discovery of potent antitumor agents // Org. Biomol. Chem. 2013. V. 11. P. 4154. <https://doi.org/10.1039/c3ob40654g>
25. Tabaszewska M., Antoniewska A., Rutkowska J., Skoczylas L., Slupski J., Skoczen-Slupska R. Bioactive components, volatile profile and *in vitro* antioxidative properties of *Taxus baccata* L. red arils // Molecules. 2021. V. 26. P. 4474. <https://doi.org/10.3390/molecules26154474>
26. Bekhouche M., Benyammi R., Khelifi Slaoui M., Khelifi L., Morsli A. Free radical scavenging activity and detailed flavonoid profiling of Algerian yew (*Taxus baccata* L.) by LC–ESI–MS/MS // IJPSR. 2021. V. 12. P. 2613. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(5\).2613-19](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(5).2613-19)
27. Филиппова С.Н., Логвина А.О., Спиридович Е.В. Органо- и тканеспецифические особенности проявления антирадикального потенциала и содержания фенольных соединений в растениях рода *Taxus* spp. // Экспериментальная биология и биотехнология. 2022. Т. 1. С. 48. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-1-48-58>
28. Pinto A., Lemos T., Silveira I., Aragao I. *Taxus baccata* intoxication: the sun after the electrical storm // Rev. Bras. Ter. Intensiva. 2021. V. 33. P. 172. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20210019>

29. Valis M., Koci J., Tucek D., Lutonsky T., Kopova J., Barton P., Vysata O., Krajickova D., Korabecny J., Masopust J., Klzo L. Common yew intoxication: a case report // J. Med. Case Rep. 2014. V. 8. P. 4.
<https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-4>
30. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Москва: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
31. Некопа С.В., Комов В.П. Способность к каллусогенезу у эксплантов хвои пяти видов рода *Taxus* L. // Растительные ресурсы. 2001. Т. 37. С. 100.
32. Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дедифференциации тканей тисса ягодного и тисса канадского в условиях *in vitro* // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 755.
33. Загоскина Н.В., Зайцева С.М., Александрова М.С. Изменения в образовании фенольных соединений при введении клеток тисса ягодного (*Taxus baccata* L.) и тисса канадского (*Taxus canadensis* Marsh.) в культуру *in vitro* // Биотехнология. 2007. В. 1. С.29.
34. Fett-Neto A.G., Melanson S.J., Nicholson S.A., Pennington J.J., DiCosmo F. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata* // Biotech. Bioeng. 1994. V.44. P. 967.
<https://doi.org/10.1002/bit.260440813>
35. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactors // Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology / Eds. K.Y. Paek, H.N. Murthy, J.J. Zhong. Dordrecht: Springer. 2014. P. 563.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_23
36. Cusido R.M., Onrubia M., Sabater-Jara A.B., Moyano E., Bonfill M., Goossens A., Angeles Pedreno M., Palazon J. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. // Biotechnol. Adv. 2014. V. 32. P. 1157.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.002>
37. Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Гайсинский В.В., Кочкин Д.В. Получение и характеристика каллусной и суспензионной культур клеток тиса Валлиха (*Taxus wallichiana* Zuss.) // Вестник СВФУ. 2018. № 2. С. 18.
<https://doi.org/10.25587/SVFU.2018.64.12127>
38. Глоба Е.Б., Черняк Н.Д., Носов А.М. Получение культуры клеток из уникального растения тиса *Taxus baccata* // Материалы Международной конференции с элементами научной школы для молодежи «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере». Якутск, 2010. С. 97.
39. Ketchum R.E.B., Gibson D.M. Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus* // Plant Cell Tiss Organ Cult. 1996. V. 46. P. 9.
<https://doi.org/10.1007/BF00039691>
40. Kochkin D.V., Globa E.B., Demidova E.V., Gaisinsky V.V., Galishev B.A., Kolotyrkina N.G., Kuznetsov V.I., Nosov A.M. Occurrence of 14-hydroxylated taxoids in the plant in vitro cell cultures of different yew species (*Taxus* spp.) // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. V. 476. P. 337.
<https://doi.org/10.1134/S1607672917050131>
41. Кочкин Д.В., Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Гайсинский В.В., Кузнецов В.В., Носов А.М. Обнаружение таксуюннанина С в суспензионной культуре клеток тиса канадского (*Taxus canadensis*) // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. С. 374.
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524853374-376>
42. Bonfill M., Exposito O., Moyano E., Cusido R.M., Palazon J., Pinol M.T. Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2006. V. 42. P. 422.
<https://doi.org/10.1079/IVP2006761>
43. Senger R.S., Phisalaphong M., Karim M.N., Linden J.C. Development of a culture sub-population induction model: signaling pathways synergy and taxanes production by *Taxus canadensis* // Biotechnol. Prog. 2006. V. 22. P. 1671.
<https://doi.org/10.1021/bp0602552>
44. Mirjalili N., Linden J.C. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models // Biotechnol. Prog. 1996. V. 12. P. 110.
<https://doi.org/10.1021/bp9500831>
45. Bai J., Kitabatake M., Toyozumi K., Fu L., Zhang S., Dai J., Sakai J., Hirose K., Yamori T., Tomida A., Tsuruo T., Ando M. Production of biologically active taxoids by a callus culture of *Taxus cuspidata* // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. P. 58.
<https://doi.org/10.1021/np0301083>
46. Zhang C.H., Mei X.G., Liu L., Yu L.J. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* // Biotechnol. Letters. 2000. V. 22. P. 1561.
<https://doi.org/10.1023/A:1005684901329>
47. Khosroushahi A.Y., Valizadeh M., Ghasempour A., Khosrowshahi M., Naghdibadi H., Dadpour M.R., Omid Y. Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* // Cell Biol. Intern. 2006. V. 30. P. 262.
<https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.11.004>
48. Bonfill M., Bentebibel S., Moyano E., Palazon J., Cusido R.M., Eibl R., Pinol M.T. Paclitaxel and baccatin III production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cells of *Taxus baccata* // Biol. Plant. 2007. V. 51. P. 647.
<https://doi.org/10.1007/s10535-007-0137-2>
49. Onrubia M., Moyano E., Bonfill M., Cusido R.M., Goossens A., Palazon J. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate // J. Plant. Physiol. 2013. V. 170. P. 211.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.004>
50. Furmanowa M., Oledzka H., Sykowska-Baranek K., Jozefowicz J., Gieracka S. Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidata* and *Taxus × media* by some elicitors and precursors // Biotechnol. Letters. 2000. V. 22. P. 1449.
<https://doi.org/10.1023/A:1005611114628>
51. Amirkavei Najafabadi B., Qavami N., Ebrahimi M.A., Ebrahimi P., Zarinpanjeh N. Enhancement of taxol production by applying amino acid complex along with chitosan in suspension culture of *Taxus baccata* L. //

- J. Med. Plants. 2020. V. 19. P. 99.
<https://doi.org/10.29252/jmp.19.76.99>
52. Vidal-Limon H.R., Almagro L., Moyano E., Palazon J., Pedreno M.A., Cusido R.M. Perfluorodecalins and hexenol as inducers of secondary metabolism in *Taxus media* and *Vitis vinifera* cell cultures // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 335.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00335>
 53. Barrales-Cureno H.J., Ramos Valdivia A.C., Soto Hernandez M. Increased production of taxoids in suspension cultures of *Taxus globosa* after elicitation // Future Pharm. 2022. V. 2. P. 45.
<https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2010004>
 54. Veeresham C., Mamatha R., Prasad Babu Ch., Srisilam K., Kokate C.K. Production of taxol and its analogues from cell cultures of *Taxus wallichiana* // Pharm. Biol. 2003. V. 41. P. 426.
<https://doi.org/10.1076/phbi.41.6.426.17822>
 55. Mirjalili N., Linden J.C. Gas phase composition effects on suspension of *Taxus cuspidata* // Biotechnol Bioeng. 1995. V. 48. P. 123.
<https://doi.org/10.1002/bit.260480206>
 56. Linden J., Haigh J.R., Mirjalili N., Phisaphalong M. Gas concentration effects on secondary metabolite production by plant cell cultures // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2001. V. 72. P. 27.
https://doi.org/10.1007/3-540-45302-4_2
 57. Kim S.I., Choi H.K., Kim J.H., Lee H.S., Hong S.S. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis* // Enzym. Microb. Technol. 2001. V. 28. P. 202.
[https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00292-1](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00292-1)
 58. Choi H., Kim S., Son J., Hong S., Lee H., Lee H. Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis* // Enzyme Microb. Technol. 2000. V. 27. P. 593.
[https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00255-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00255-6)
 59. Zhong J.J., Yue C.J. Plant cells: secondary metabolite heterogeneity and its manipulation // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2005. V. 100. P. 53.
<https://doi.org/10.1007/b136412>

УДК 581.1.577.21:575.113.12

КОЭКСПРЕССИЯ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ ФЛАВОНОИДНОГО ПУТИ ВЫЯВЛЯЕТ ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ В ОРГАНАХ БАКЛАЖАНА (*Solanum melongena* L.)

© 2023 г. М. А. Филюшин^а, *, А. В. Щенникова^а, Е. З. Кочиева^а

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

Баклажан (*Solanum melongena* L.) является экономически значимой овощной культурой, фиолетово-окрашенные плоды которого обогащены антоцианидинами. В данной работе в геноме баклажана были идентифицированы гомологи основных известных структурных (*CHS1*, *CHS2*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS* и *UFGT*) и регуляторных (*TT8*, *GL3*, *bHLH137*, *bHLH143*, *MYB1*, *MYB2* и *MYB75*) генов биосинтеза антоцианов, а также гена транспортера антоцианидинов (*GSTF12*). Охарактеризована экспрессия данных генов в сопоставлении с содержанием суммы антоцианов и окраской листа, лепестков цветка и кожицы плода. Показано, что профиль экспрессии генов соответствует окраске и присутствию антоцианов в ткани, а также указывает на существование органоспецифичных особенностей регуляции транскрипции генов, кодирующих транскрипционные факторы комплекса MBW. Результаты корреляционного анализа подтверждают участие генов *SmbHLH137*, *SmTT8*, *SmMYB2* и *SmMYB75* в регуляции экспрессии структурных генов в лепестках цветка, а *SmGL3*, *SmTT8* и *SmMYB1* – в кожице плода.

Ключевые слова: баклажан, *Solanum melongena* L., окраска плода, антоцианы, регуляция биосинтеза антоцианов

DOI: 10.31857/S0015330322600747, **EDN:** IBTJGR

ВВЕДЕНИЕ

Баклажан (*Solanum melongena* L.) является экономически значимой и популярной овощной культурой. В последнее время плоды баклажана рассматриваются как функциональный продукт питания, так как они обогащены широким спектром фенольных соединений: мякоть является источником фенольных кислот, а кожица – антоцианов. Кроме того, листья содержат большое количество кемпферола [1, 2]. Мощные антиоксидантные свойства плодовых экстрактов баклажана делают их применение перспективным для снижения риска различных заболеваний человека [2, 3].

Кожица плода *S. melongena* характеризуется белой, зеленой или фиолетовой окраской [2, 4]. Оттенки окраски кожицы от бледно-лилового до черно-фиолетового обусловлены синтезом и накоплением разного количества антоцианов с преобладанием гликозидов дельфинидина (93–98% от общей суммы) и минорными включениями производных других антоцианидинов [2, 4]. Другие известные виды баклажана (*Solanum aethiopicum* L., *Solanum macrocarpon* L. и др.), широко возде-

лываемые в Африке и Юго-Восточной Азии, формируют плоды желтой, оранжевой или красной окраски за счет накопления каротиноидов. Содержание антоцианов в таких плодах, также как в плодах баклажана с белой и зеленой кожицей, минимально [4].

Путь биосинтеза антоцианов в растениях высоко консервативен и является ветвью пути биосинтеза флавоноидов. В результате последовательных ферментативных реакций, катализируемых халконсинтазой (CHS), халконизомеразой (CHI), флаванон-3-гидроксилазой (F3H), флавоноид-3'-гидроксилазой (F3'H), флавоноид-3'5'-гидроксилазой (F3'5'H), дигидрофлавонол-4-редуктазой (DFR) и антоцианидинсинтазой (ANS), образуются окрашенные антоцианидины – пеларгонидин, цианидин и дельфинидин. Дальнейшая модификация антоцианидинов с участием UDP-глюкозофлавоноид-3-О-глюкозилтрансферазы (UFGT) приводит к образованию стабильных, водорастворимых пигментов. Антоцианидины пеонидин, петунидин и мальвидин образуются в результате метилирования циани-

дина и дельфинидина под действием О-метилтрансферазы (ОМТ) [5–7].

В растительных клетках флавоноиды, в том числе антоцианы, синтезируются в цитозоле, а затем транспортируются и накапливаются в вакуолях [8]. Транспорт флавоноидов в вакуоли осуществляется специфической глутатион-S-трансферазой класса *phi* (кодируется геном *GSTF12*) [9]. Для многих видов растений показана высокая корреляция уровня транскриптов транспортера *GSTF12* с накоплением антоцианов в тканях [9–11].

Экспрессия генов пути биосинтеза антоцианов координируется MBW-комплексом, включающим транскрипционные факторы (ТФ) семейств R2R3-MYB, bHLH и WD-repeat [12, 13]. Различия в составе участников MBW-комплекса определяют пространственно-временную регуляцию синтеза антоцианов в растении [14, 15]. Показано, что ТФ семейства R2R3-MYB также регулируют транскрипцию гена транспортера антоцианов *GSTF12* [11].

В транскриптомах *S. melongena*, по гомологии с известными последовательностями томата и картофеля, идентифицированы основные структурные гены пути биосинтеза антоцианов и определены профили их экспрессии в сопоставлении с содержанием антоцианов [16–18]. К изученным регуляторным генам пути биосинтеза антоцианов у баклажана относятся отдельные представители семейств R2R3-MYB (*SmMYB1/SmMYB113* (KF727476.1), *SmMYB2* (KF727477.1)), bHLH (*Sm-bHLH1/SmGL3* (GLABRA3; KF727475.1), *SmTT8* (TRANSPARENT TESTA8; KP006503.1)) и WD40-repeat (*SmAN11* (KF727473)) [16, 19]. У родственных баклажану видов, томата (*Solanum lycopersicum* L.) и перца (*Capsicum annuum* L.), идентифицированы новые ТФ семейств R2R3-MYB и bHLH, ассоциированные с биосинтезом антоцианов [15, 20]. Так, показано, что накопление антоцианов в плодах томата связано с активностью гена *SIMYB75*; сверхэкспрессия данного гена приводит к существенному росту содержания антоцианов, а также общего содержания фенолов, флавоноидов, растворимых сухих и ароматических летучих веществ [20]. Анализ транскриптомов кожицы плода перца, приобретающей пурпурную окраску в условиях ультрафиолетового излучения, выявил факторы транскрипции CabHLH137 и CabHLH143, которые связываются с промоторами структурных генов пути биосинтеза антоцианов, активируя их транскрипцию [15].

Цель работы – поиск в геноме *S. melongena* последовательностей структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов, включая генов-гомологов *SIMYB75*, *CabHLH137*, *CabHLH143* и *GSTF12*; изучение профилей их экспрессии в различных органах трех сортов баклажана и опреде-

ление взаимосвязи уровней транскрипции с содержанием антоцианов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения работы в 2022 г. образцы баклажана *S. melongena* сортов Снежный, Влас и Агат, различающиеся окраской спелого плода, были выращены до стадии плодоношения в пленочной теплице Федерального научного центра овощеводства (Московская обл.). Все три сорта формируют зеленые листья и цветки с фиолетовыми лепестками. Плоды сорта Снежный имеют белую/светло-желтую окраску в технической/биологической спелости. Плоды сортов Влас и Агат темно-фиолетовые и почти черные в технической спелости и светлеют к стадии биологической спелости (рис. 1).

В августе с растений были собраны листья, цветки, незрелые плоды (стадия технической спелости) и спелые плоды (стадия биологической спелости). У плодов отделяли экзокарп (кожицу), у цветков – лепестки, у листьев – фрагменты ткани без жилок. Собранный растительный материал растирали в жидком азоте и использовали для биохимического анализа и анализа экспрессии генов. Содержание суммы антоцианов (в пересчете на дельфинидин-3-рутинозид) определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах [21] в двух биологических и трех технических повторностях. Суммарную РНК выделяли и очищали от примесей ДНК с помощью наборов RNeasy Plant Mini Kit и RNeasy free DNasey set (“QIAGEN”, Германия); кДНК синтезировали с использованием набора GoScript™ Reverse Transcription System (“Promega”, США).

Поиск структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов проводили в геномных (GCA_000787875.1) [22] и транскриптомных данных баклажана *S. melongena*, доступных в GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для поиска по гомологии использовали последовательности известных генов баклажана (*SmMYB1* (KF727476.1), *SmMYB2* (KF727477.1), *SmTT8* (KP006503.1), *SmGL3* (KP006502.1)), томата *S. lycopersicum* (*CHS1* (NM_001247104.2), *CHS2* (NM_001247107.2), *CHI* (NM_001320711.1), *F3H* (NM_001329483.1), *F3'5'H* (NM_001247911.2), *DFR* (Z18277.1), *ANS* (NM_001374394.1), *UGFT* (XM_004249399.4), *GSTF12* (XM_004232621.4), *SIMYB75* (NM_001279063.2)) и перца *C. annuum* (*bHLH137* (XM_016712236.2), *bHLH143* (XM_016695337.2)). Выравнивание найденных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Молекулярную массу (MW) и изоэлектрическую точку (pI) белков определяли с помощью ExPASy ProtParam (<https://www.web.expasy.org/protparam>).

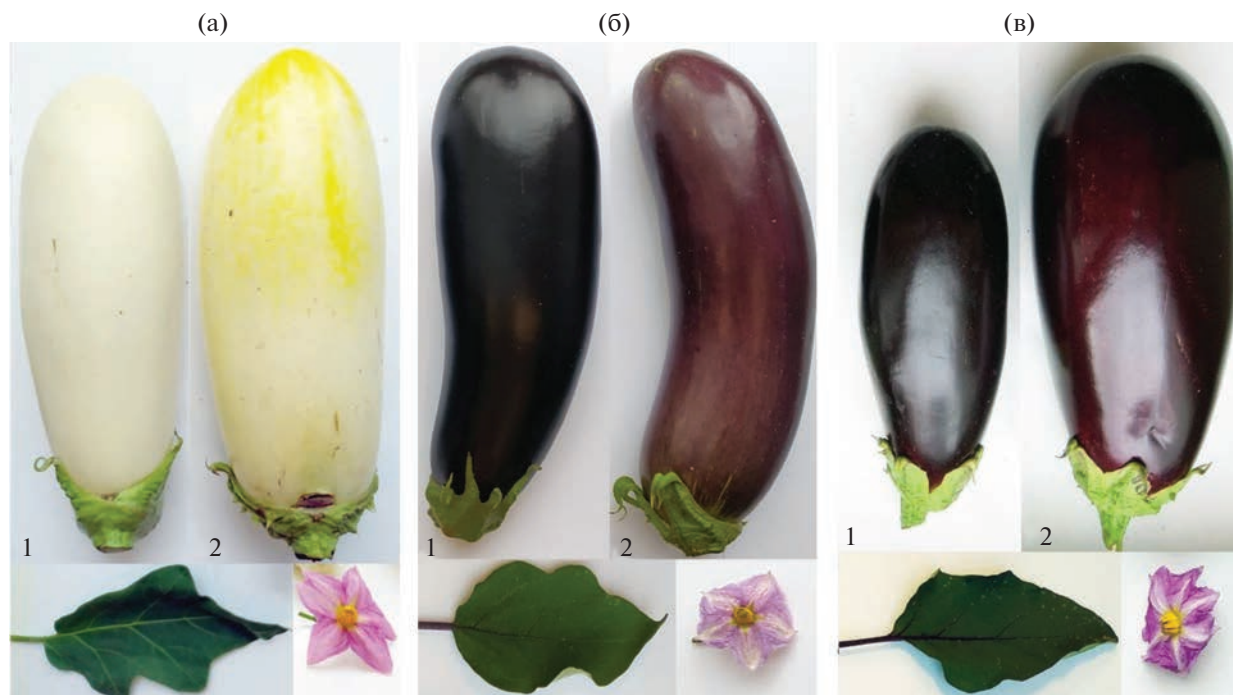


Рис. 1. Листья, цветки и плоды (1 — незрелый плод (техническая спелость), 2 — спелый плод (биологическая спелость)) сортов баклажана Снежный (а), Влас (б) и Агат (в).

Профиль экспрессии структурных (*CHS1*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *UFGT* и *GSTF12*) и регуляторных (*GL3*, *TT8(MYC)*, *bHLH137*, *bHLH143*, *MYB1*, *MYB2* и *MYB75*) генов пути биосинтеза антоцианов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в трех технических повторностях. Праймеры разрабатывали на основе найденных в базе данных NCBI последовательностей (Дополнительные материалы, табл. 1). Относительный уровень экспрессии генов оценивали, нормализуя по экспрессии референсного гена *GAPDH* [16]. ПЦР-РВ проводили с помощью набора “Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и амплификатора CFX96 Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad Laboratories”, США) в следующих условиях: 95°C — 5 мин.; 40 циклов (95°C — 15 с, 62°C — 50 с). Визуализацию данных ПЦР-РВ, а также регрессионный анализ (поиск корреляции между уровнем транскриптов гена и содержанием антоцианов) осуществляли в программе GraphPad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структурные и регуляторные гены пути биосинтеза антоцианов в геноме баклажана. В геноме баклажана *S. melongena* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCA_000787875.1/) был проведен поиск по гомологии структурных и регуля-

торных генов биосинтеза антоцианов, включая *SlMYB75*, *CabHLH137*, *CabHLH143* и *GSTF12*. В результате были найдены и охарактеризованы предположительные ортологи всех известных структурных (*CHS1*, *CHS2*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS* и *UFGT*) и регуляторных (ТФ семейств *bHLH* (*TT8*, *GL3*, *bHLH137* и *bHLH143*) и *R2R3-MYB* (*MYB1*, *MYB2* и *MYB75*)) генов, а также гена транспортера антоцианидинов — глутатион-S-трансферазы *GSTF12*. Основные характеристики генов *S. melongena* и кодируемых ими белков приведены в табл. 1.

Органоспецифичные профили экспрессии структурных генов пути биосинтеза антоцианов. Профили экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов и транспортера антоцианидинов *SmGSTF12* были определены в листьях, лепестках цветка, кожце незрелого и спелого плода сортов баклажана Снежный, Влас и Агат (рис. 2).

У сорта Снежный в листьях экспрессии генов биосинтеза антоцианов не выявлено, за исключением следовых количеств транскриптов *SmCHS2* и *SmF3H*; в лепестках, имеющих фиолетовую окраску, присутствовали транскрипты всех генов (за исключением *SmCHS2*) и *SmGSTF12*. В белой кожце незрелого плода сорта Снежный транскрипты генов не обнаружены, тогда как в светло-желтой кожце спелого плода зафиксированы транскрипты ранних генов флавоноидного пути (*SmCHS1*, *SmCHS2* и *SmF3H*) (рис. 2).

Таблица 1. Характеристика структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов баклажана *S. melongena*

Ген	Контиг/ID*	Ген, пн	Кол-во экзонов	Кодирующая часть, пн	Белок, ао	MW, кДа	pI
Структурные гены пути биосинтеза антоцианов							
<i>CHS1</i>	Sme2.5_13923.1/ Sme2.5_13923.1_g00001.1	1254	2	1170	389	42.5	7.17
<i>CHS2</i>	Sme2.5_02154.1/ Sme2.5_02154.1_g00001.1	1344	2	1170	389	42.7	5.98
<i>CHI</i>	Sme2.5_01193.1/ Sme2.5_01193.1_g00009.1	1811	4	705	234	25.2	5.38
<i>F3H</i>	Sme2.5_00015.1/ Sme2.5_00015.1_g00016.1	2613	3	1101	366	41.1	5.39
<i>F3'5'H</i>	Sme2.5_04313.1/ Sme2.5_04313.1_g00001.1	3064	3	1542	513	57.7	8.88
<i>DFR</i>	Sme2.5_01401.1/ Sme2.5_01401.1_g00004.1	1638	6	1149	382	42.6	5.47
<i>ANS</i>	Sme2.5_01638.1/ Sme2.5_01638.1_g00005.1	1556	2	1242	413	46.7	5.34
<i>UFGT</i>	Sme2.5_00228.1/ Sme2.5_00228.1_g00013.1	1329	1	1329	442	49.2	5.92
Глутатион-S-трансфераза GSTF12							
<i>GSTF12</i>	Sme2.5_00172.1/ Sme2.5_00172.1_g00024.1	1735	3	693	230	26.3	5.88
ТФ семейства bHLH							
<i>TT8</i>	Sme2.5_00592.1/ Sme2.5_00592.1_g00005.1	8531	9	1896	631	70.1	5.17
<i>GL3</i>	Sme2.5_12406.1/ Sme2.5_12406.1_g00003.1	4556	7	1887	628	70.8	5.61
<i>bHLH137</i>	Sme2.5_06479.1/ Sme2.5_06479.1_g00003.1	2443	7	1032	343	38.2	6.27
<i>bHLH143</i>	Sme2.5_06288.1/ Sme2.5_06288.1_g00003.1	1092	1	1092	363	39.9	4.72
ТФ семейства R2R3-MYB							
<i>MYB1</i>	Sme2.5_05099.1/ Sme2.5_05099.1_g00002.1	1230	3	771	256	29.6	6.17
<i>MYB2</i>	Sme2.5_00538.1/ Sme2.5_00538.1_g00005.1	3727	3	837	278	32.1	8.48
<i>MYB75</i>	Sme2.5_13100.1/—	1051	3	822	273	31.8	8.87

* Согласно [22].

У сортов Влас и Агат, имеющих фиолетовую окраску лепестков и кожицы плода, показана активность генов в лепестках (за исключением *SmCHS2* у сорта Агат) и кожице незрелого плода; в кожице спелого плода выявлены транскрипты *SmF3H* (оба сорта) и *SmCHS1* (сорт Агат). В листьях найдены следовые количества транскриптов *SmCHS2* и *SmF3H*. Транскрипты *GSTF12* обнаружены только в лепестках и кожице незрелого плода (рис. 2).

Органоспецифичные профили экспрессии генов ТФ семейств bHLH и R2R3-MYB. В тех же органах, где были определены профили экспрессии структурных генов, проанализированы профили экспрессии генов ТФ семейств bHLH и R2R3-MYB, ассоциированных с биосинтезом антоцианов (рис. 3, 4).

В результате транскрипты гена *SmGL3* выявлены только в фиолетовой кожице плода у сортов

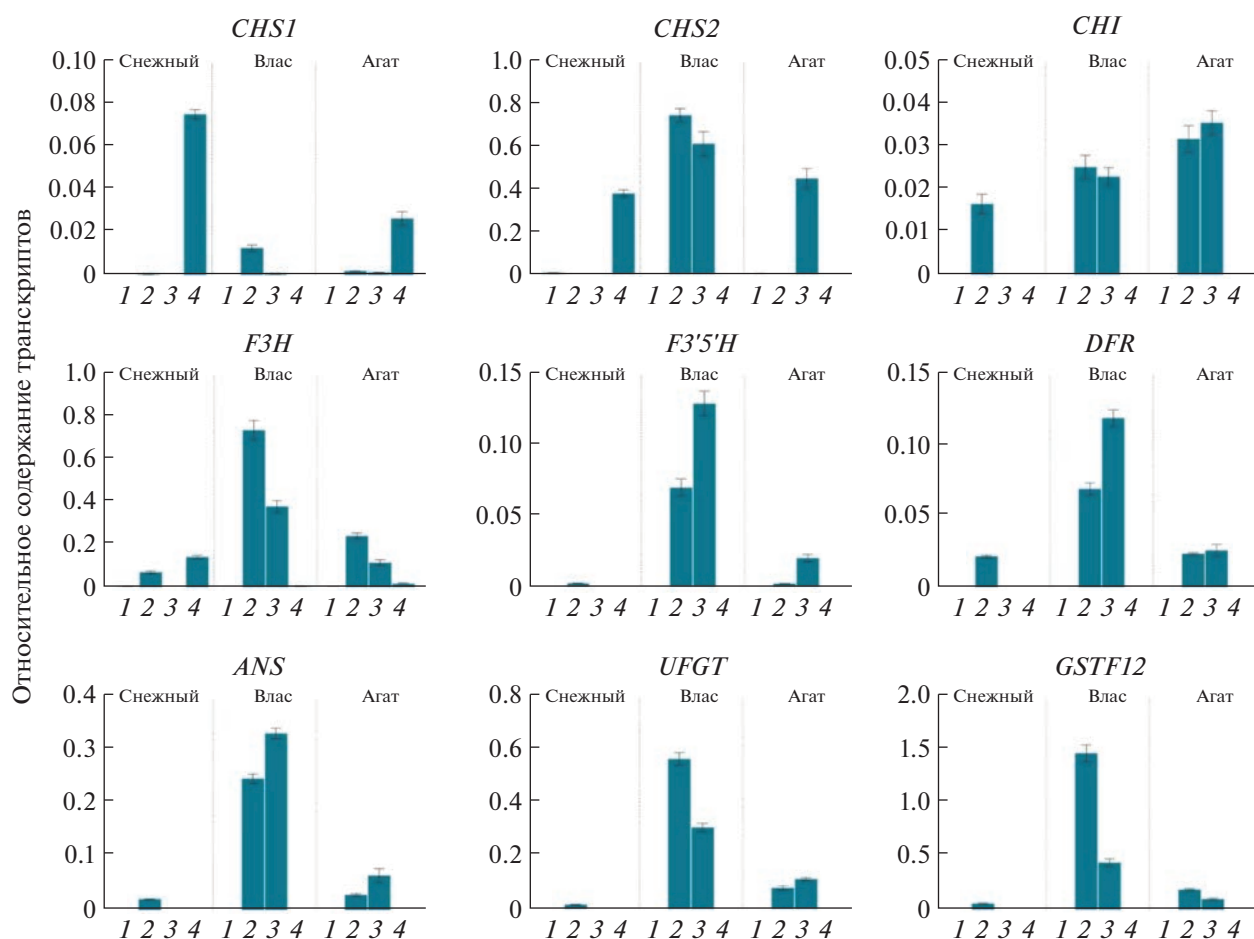


Рис. 2. Профили экспрессии структурных генов флавоноидного пути (*CHS1*, *CHS2*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *UFGT*) и транспортера антоцианидинов (*GSTF12*) в листьях (1), лепестках цветка (2), коже незрелого (3) и спелого (4) плодов сортов баклажана Снежный, Влас и Агат.

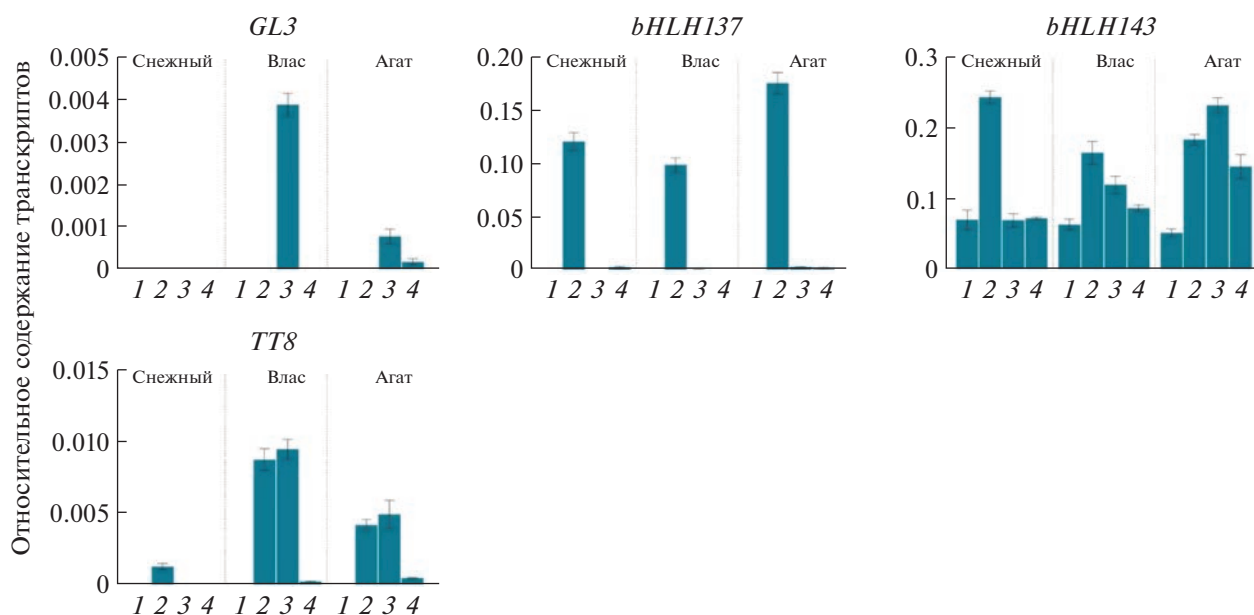


Рис. 3. Профили экспрессии генов ТФ семейства bHLH в листьях (1), лепестках цветка (2), коже незрелого (3) и спелого (4) плодов сортов баклажана Снежный, Влас и Агат.

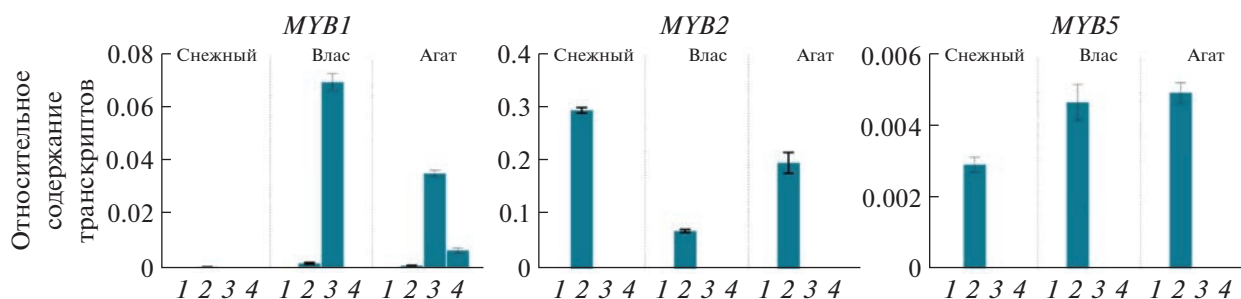


Рис. 4. Профили экспрессии генов ТФ семейства R2R3-MYB в листьях (1), лепестках цветка (2), кожице незрелого (3) и спелого (4) плодов сортов баклажана Снежный, Влас и Агат.

Влас (стадия технической спелости) и Агат (обе стадии спелости). Ген *SmbHLH137* высоко экспрессировался в лепестках всех трех сортов, небольшие количества транскриптов гена выявлены в кожице плодов. Экспрессия гена *SmbHLH143* обнаружена во всех анализируемых органах с максимумом в лепестках цветка (сорта Снежный и Влас) или кожице незрелого плода (сорт Агат). Транскрипты *SmTT8* детектированы в лепестках и кожице плодов (сорта Влас и Агат) или только в лепестках (сорт Снежный) (рис. 3).

Экспрессия гена *SmMYB1* у анализируемых сортов баклажана выявлена в лепестках и в кожице плодов сортов Влас (незрелый плод) и Агат (незрелый и спелый плод). Транскрипты *SmMYB2* и *SmMYB75* обнаружены только в лепестках всех трех сортов (рис. 4).

Органоспецифичное содержание суммы антоцианов и его связь с уровнем транскриптов структурных и регуляторных генов биосинтеза антоцианов. В листьях, лепестках цветка и кожице незрелого и спелого плодов сортов баклажана Снежный, Влас и Агат была определена сумма антоцианов. Показано, что листья всех сортов, имеющих зеленую

окраску, содержали ~25 мкг/г антоцианов. В фиолетовых лепестках цветка у сортов Снежный и Влас содержание антоцианов было сходным (~40 мкг/г), у сорта Агат — выше в 1.4 раза (~55 мкг/г). В кожице незрелого плода у сортов Влас и Агат сумма антоцианов составила 1054 и 1555 мкг/г, а в кожице спелого плода — 367 и 206 мкг/г, соответственно; это визуально соответствует изменению окраски плода по мере созревания с темно-фиолетовой/черной на более светлую, коричнево-фиолетовую (рис. 1, 5). У сорта Снежный содержание антоцианов в кожице плодов составило менее 20 мкг/г (рис. 5).

Содержание антоцианов было сопоставлено с уровнями экспрессии структурных и регуляторных генов флавоноидного пути. Для анализируемых образцов баклажана была выявлена значимая корреляция содержания антоцианов с уровнями транскриптов генов *SmCHI*, *SmGL3* и *SmMYB1* (рис. 6). Отдельно были определены значения коэффициентов корреляции содержания антоцианов в листьях, лепестках цветка и кожице плодов с уровнями транскриптов генов. В листьях содержание антоцианов коррелировало с уровнями транскриптов *SmCHS2* и *SmF3H*; в лепестках цветка — *SmCHI* и *SmbHLH137*; в кожице плодов — всех анализируемых генов, кроме *SmCHS1*, *SmF3H* и *SmbHLH137* (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Растение баклажана *S. melongena* является богатым источником различных фенольных соединений, благодаря чему в настоящее время плоды баклажана считаются функциональным продуктом питания [2, 3]. За счет высокого содержания антоцианов (преимущественно производных дельфинидина) кожица плода баклажана имеет фиолетовую окраску с палитрой оттенков от бледно-розового до черного [2, 4, 16].

В настоящем исследовании с помощью поиска в геноме *S. melongena* нами были определены гомологи всех основных известных структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов, а

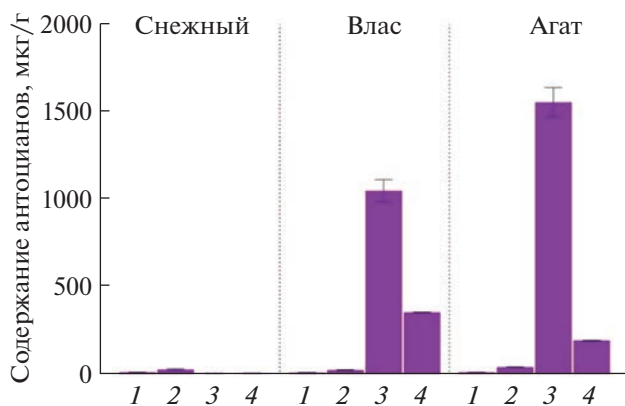


Рис. 5. Содержание антоцианов в листьях (1), лепестках цветка (2), кожице незрелого (3) и спелого (4) плодов сортов баклажана Снежный, Влас и Агат; мкг/г сырого веса.

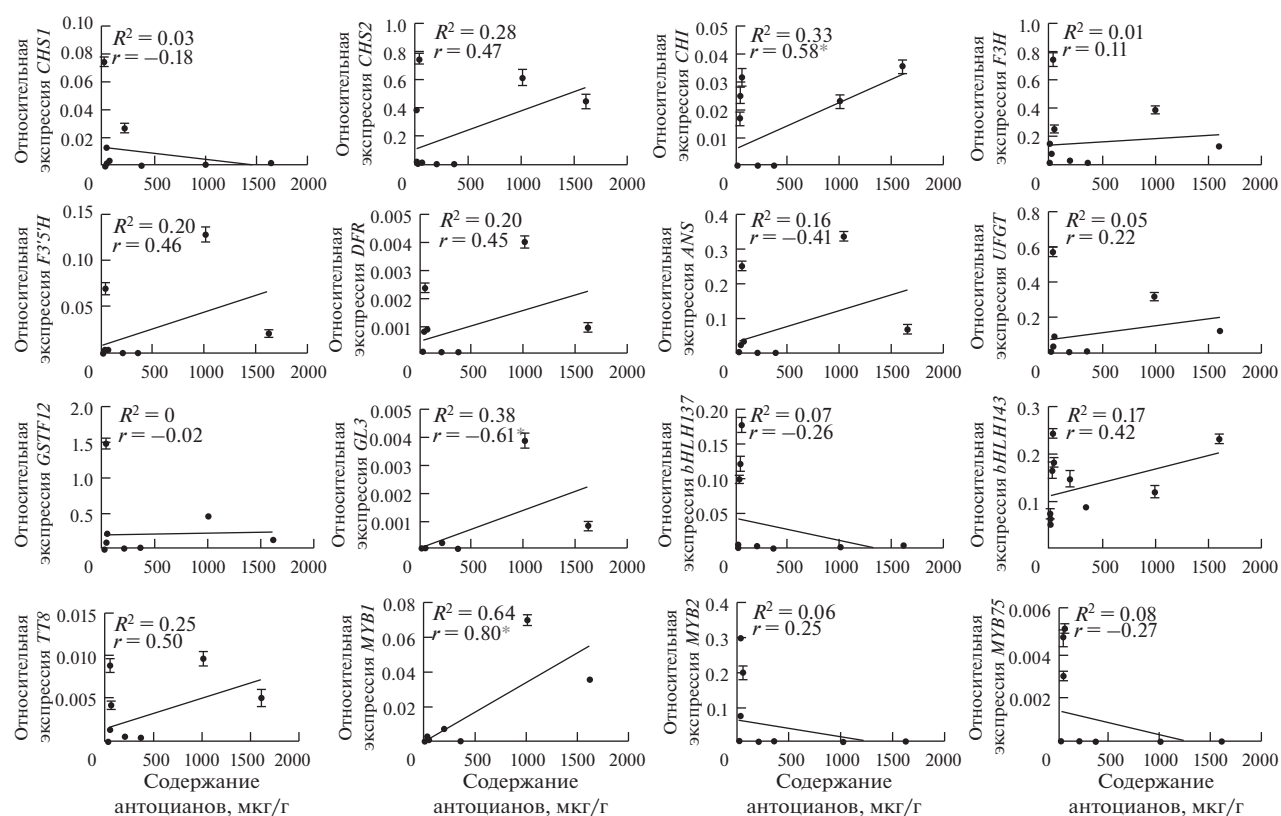


Рис. 6. Линейная регрессия содержания антоцианов совокупно во всех анализируемых органах баклажана с экспрессией структурных и регуляторных генов флавоноидного пути. R^2 — коэффициент множественной корреляции, r — коэффициент корреляции Пирсона. Звездочкой отмечены значения с $P \leq 0.05$.

также гена транспортера антоцианидинов *GSTF12* (табл. 1). С целью охарактеризовать совокупную роль данных генов в определении содержания антоцианов в различных органах баклажана был определен профиль их экспрессии у образцов трех сортов *S. melongena*, формирующих зеленые листья, цветки с фиолетовыми лепестками и плоды, кожа которых имеет окраску, различающуюся между сортами (белую у сорта Снежный и оттенки фиолетового у сортов Влас и Агат) (рис. 1).

В целом, для пигментированных тканей (лепестков цветка всех сортов и кожицы плода сортов Влас и Агат) было характерно присутствие транскриптов всех исследуемых генов (кроме *SmMYB2* и *SmMYB75* в плодах) (рис. 2–4), что подтверждает их участие в биосинтезе антоцианов. В то же время профили экспрессии генов у фиолетовоплодных сортов совпадали, и различие состояло лишь в уровнях транскриптов (и оттенках фиолетовой окраски, соответственно).

Таблица 2. Значения коэффициентов корреляции Пирсона (r) между уровнем транскриптов анализируемых генов и содержанием суммы антоцианов отдельно в листьях, лепестках цветка и кожице плода баклажана ($r \geq 0.50$ свидетельствует о наличии корреляции).

	<i>CHS1</i>	<i>CHS2</i>	<i>CHI</i>	<i>F3H</i>	<i>F3'5'H</i>	<i>DFR</i>	<i>ANS</i>	<i>UFGT</i>	<i>GSTF12</i>	<i>GL3</i>	<i>bHLH137</i>	<i>bHLH143</i>	<i>TT8</i>	<i>MYB1</i>	<i>MYB2</i>	<i>MYB75</i>
Листья	—	0.81	—	0.71	—	—	—	—	—	—	—	–0.27	—	—	—	—
Лепестки цветка	–0.37	–0.45	0.85	–0.22	–0.46	–0.42	–0.35	–0.36	–0.38	—	0.94	–0.33	–0.12	–0.07	0.02	0.63
Кожица плода	–0.47	0.65	0.98	0.48	0.50	0.55	0.54	0.67	0.58	0.53	0.40	0.85	0.76	0.75	—	—

“—” — Коэффициент не рассчитывали в связи с отсутствием транскриптов гена.

Заметим, что в белых и светло-желтых тканях кожицы технически и биологически спелого плода сорта Снежный были обнаружены транскрипты только ранних структурных генов флавоноидного пути (*CHS1*, *CHS2* и *F3H*) (рис. 2). Это может свидетельствовать о синтезе бесцветных фенольных соединений и о предположительном наличии блоков в пути биосинтеза окрашенных антоцианидинов в плодах. Отсутствие в кожице транскриптов большинства регуляторных генов (рис. 3, 4) говорит о том, что в плодах сорта Снежный не происходит образования регуляторного комплекса MBW в связи с дефицитом двух главных его составляющих — ТФ семейств bHLH и R2R3-MYB. Соответственно, не выполняется активация поздних структурных генов пути биосинтеза антоцианов и гена транспортера антоцианидинов (рис. 2), так как для этого необходим функциональный MBW-комплекс [11].

Интересно, что подобных блоков нет в лепестках цветка сорта Снежный, судя по профилю экспрессии анализируемых генов (рис. 2–4), что предполагает органоспецифичные нарушения в регуляции транскрипции генов bHLH и MYB MBW-комплекса в плодах, характерные для данного белоплодного сорта. При этом транскрипты гена *SmMYB1* практически отсутствуют как в кожице плода, так и в лепестках цветка, что, вероятно, связано с обнаруженной ранее у сорта Снежный делецией 26 пн (конец интрона 1 — начало экзона 2), из-за которой в последовательности зрелой мРНК полностью отсутствует второй экзон и сбивается рамка считывания [23]. Праймеры, разработанные нами для анализа экспрессии гена *SmMYB1*, попадают на транскрибируемый участок, поэтому наличие следовых количеств транскриптов гена в лепестках и их отсутствие в кожице плода косвенно подтверждают предположение о нарушении регуляции транскрипции генов MYB MBW-комплекса в плоде сорта. К примеру, это может происходить благодаря повышенной наработке белков SmBIC (blue light inhibitors of cryptochromes), которые взаимодействуют с фотозабужденным SmCRY2, ингибируя его активность и высвобождая убиквитинную активность COP1, тем самым подавляя экспрессию генов биосинтеза антоцианов (в частности, *SmMYB1*, *SmTT8* и *SmHY5*) [24].

Подчеркнем, что в кожице плода фиолетово-плодных сортов Влас и Агат из трех генов ТФ R2R3-MYB были обнаружены транскрипты только *SmMYB1* (рис. 4). Это свидетельствует об участии именно данного ТФ (но не *SmMYB2* и *SmMYB75*) в образовании MBW-комплекса в кожице плода. В то же время в лепестках цветка этих сортов низкие уровни транскриптов *SmMYB1* и одновременно высокие *SmMYB2* и *SmMYB75* (рис. 4) предполагают преимущественное участие в MBW-комплексе ТФ *SmMYB2* и *SmMYB75*. В этой связи

высокий уровень транскриптов *SmMYB2* и *SmMYB75* в лепестках цветка сорта Снежный (рис. 4) может свидетельствовать о компенсаторном (заменяющем *SmMYB1*) участии данных белков в регуляции активности структурных генов биосинтеза антоцианов.

Таким образом, полученные данные по экспрессии *SmMYB1* (также известного в литературе как *SmMYB113*) и его близких гомологов *SmMYB2* и *SmMYB75* в кожице плода (рис. 4) согласуются с ключевой ролью гена *SmMYB113* в определении разнообразия композиции антоцианов в кожице баклажана и ее окраски [4, 16]. Последние опубликованные данные предлагают в качестве участников индуцированного светом MBW-комплекса баклажана еще три ТФ семейства R2R3-MYB: *SmMYB35*, *SmMYB44* и *SmMYB86* [14, 25, 26]. Тем не менее, наши данные по экспрессии *SmMYB1*, *SmMYB2* и *SmMYB75* (рис. 4) исчерпывающе отвечают на вопрос о различии в окраске кожицы баклажана между белоплодными и фиолетово-плодными сортами. Возможно, *SmMYB35*, *SmMYB44* и *SmMYB86* выполняют дублирующие (по отношению к основным ТФ R2R3-MYB) роли. Более того, имеются сведения о *SmMYB86* как о негативном регуляторе пути биосинтеза антоцианов [26].

Другие, не менее важные участники MBW-комплекса — ТФ семейства bHLH, также способны определять различия в составе антоцианов и окраске лепестков/кожицы плода у баклажанов. Анализ экспрессии четырех генов *bHLH*, гомологи которых ассоциированы с биосинтезом антоцианов, показал, что два из них — *SmGL3* и *SmTT8* — имеют существенные различия в уровне транскриптов в кожице плода между белоплодными и фиолетово-плодными сортами (рис. 3). Это является подтверждением ранее предложенной роли для этих двух генов в регуляции накопления антоцианов в растительной ткани [27].

Профиль экспрессии других двух генов *bHLH* показывает, что *SmbHLH137* активен преимущественно в лепестках цветка *S. melongena*. В то же время повсеместное присутствие транскриптов *SmbHLH143* не коррелирует с разницей в окраске кожицы плода (рис. 3). Хотя связывание с промоторами структурных генов биосинтеза антоцианов выявлено для гомологов обоих ТФ [15], нужно учитывать, что они могут быть задействованы и в других процессах развития или стрессовых ответах растения [28–30].

Характеристикой роли генов в пути биосинтеза антоцианов может служить также корреляционный анализ зависимости между суммой антоцианов и уровнем транскриптов генов. Ожидается, в лепестках цветка присутствовала взаимосвязь наличия транскриптов анализируемых генов с наличием антоцианов (есть транскрипты — есть антоци-

аны) (рис. 2–5), однако корреляция с количеством антоцианов была выявлена только для генов *CHI* и *bHLH137* (рис. 6; табл. 2). Тем не менее, в коже плодов содержание антоцианов коррелировало с экспрессией всех анализируемых генов, за исключением *CHS1*, *F3H* и *bHLH137* (табл. 2).

Таким образом, в данной работе была охарактеризована органоспецифичная функциональная активность структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов в сравнении с содержанием суммы антоцианов и окраской. Было показано, что фиолетовоплодные сорта баклажана отличаются от белоплодного сорта профилем экспрессии анализируемых генов в коже плода, что соответствует ее окраске. Присутствие антоцианов в фиолетовых лепестках цветка и их отсутствие в белых/светло-желтых плодах у сорта Снежный, а также различия в уровне транскриптов анализируемых генов между данными органами свидетельствуют о существовании блоков пути биосинтеза антоцианидинов в коже плода данного сорта и особенностей органоспецифичной регуляции транскрипции генов ТФ комплекса MBW. На основе полученных результатов можно предположить, что в регуляции экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов в лепестках цветка *S. melongena* участвуют транскрипционные факторы *SmbHLH137*, *SmTT8*, *SmMYB2* и *SmMYB75*, а в коже плода – *SmGL3*, *SmTT8* и *SmMYB1*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда (№ 19-16-00016) и Министерства науки и высшего образования РФ.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gürbüz N., Uluişik S., Frarya A., Fraryc A., Doğanlara S. Health benefits and bioactive compounds of eggplant // Food Chem. 2018. V. 268. P. 602.
- Condurache N.N., Croitoru C., Enachi E., Bahrin G.E., Stanciuc N., Rapeanu G. Eggplant peels as a valuable source of anthocyanins: extraction, thermal stability and biological activities // Plants. 2021. V. 10: 577. <https://doi.org/10.3390/Plants10030577>
- Akhbari M., Hamed S., Aghamiri Z.S. Optimization of total phenol and anthocyanin extraction from the peels of eggplant (*Solanum melongena* L.) and biological activity of the extracts // J. Food Measure. Character. 2019. V. 13. P. 3183.
- Yang G., Li L., Wei M., Li J., Yang F. SmMYB113 is a key transcription factor responsible for compositional variation of anthocyanin and color diversity among eggplant peels // Front. Plant Sci. 2022. V. 13: 843996. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.843996>
- Ma Y., Ma X., Gao X., Wu W., Zhou B. Light induced regulation pathway of anthocyanin biosynthesis in plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22: 11116. <https://doi.org/10.3390/ijms222011116>
- Chaves-Silva S., dos Santos A.L., Chalfun A., Zhao J., Peres L.E.P., Benedito V.A. Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants – tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables // Phytochem. 2018. V. 153. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.013>
- Koes R., Verweij W., Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways // Trends Plant Sci. 2005. V. 10. P. 236.
- Zhao J. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom // Trends Plant Sci. 2015. V. 20. P. 576. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.007>
- Pérez-Díaz R., Madrid-Espinoza J., Salinas-Cornejo J., González-Villanueva E., Ruiz-Lara S. Differential roles for *VviGST1*, *VviGST3*, and *VviGST4* in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7: 1166. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01166>
- Niu M., Bao C., Chen J., Zhou W., Zhang Y., Zhang X., Su N., Cui J. RsGSTF12 contributes to anthocyanin sequestration in radish (*Raphanus sativus* L.) // Front. Plant Sci. 2022. V. 13: 870202. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.870202>
- Xue L., Huang X., Zhang Z., Lin Q., Zhong Q., Zhao Y., Gao Z., Xu C. An anthocyanin-related glutathione S-transferase, MrGST1, plays an essential role in fruit coloration in chinese bayberry (*Morella rubra*) // Front. Plant Sci. 2022. V. 13: 903333. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.903333>
- Naing A.H., Kim C.K. Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants // Plant Mol. Biol. 2018. V. 98. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0771-4>
- Ramsay N.A., Glover B.J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity // Trends Plant Sci. 2005. V. 10. P. 63.
- Li J., Ren L., Gao Z., Jiang M., Liu Y., Zhou L., He Y., Chen H. Combined transcriptomic and proteomic analysis constructs a new model for light-induced anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. P. 3069. <https://doi.org/10.1111/pce.13074>
- Wang Y., Liu S., Wang H., Zhang Y., Li W., Liu J., Cheng Q., Sun L., Shen H. Identification of the regulatory genes of UV-B-induced anthocyanin biosynthesis in pepper Fruit. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23: 1960. <https://doi.org/10.3390/ijms23041960>
- Zhang Y., Hu Z., Chu G., Huang C., Tian S., Zhao Z., Chen G. Anthocyanin accumulation and molecular analysis of anthocyanin biosynthesis-associated genes in eggplant (*Solanum melongena* L.) // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. P. 2906. <https://doi.org/10.1021/jf404574c>
- Jiang M., Liu Y., Ren L., Lian H., Chen H. Molecular cloning and characterization of anthocyanin biosynthesis genes in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Acta

- Physiol. Plant. 2016. V. 38: 163.
<https://doi.org/10.1007/s11738-016-2172-0>
18. Docimo T., Francese G., Ruggiero A., Batelli G., De Palma M., Bassolino L., Toppino L., Rotino G.L., Mennella G., Tucci M. Phenylpropanoids accumulation in eggplant fruit: characterization of biosynthetic genes and regulation by a MYB transcription factor // Front. Plant Sci. 2016. V. 6: 1233.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01233>
 19. Liu X., Han H.Q., Ge H.Y., Jiang M.M., Chen H.Y. Cloning, expression and interaction of anthocyanin-related transcription factors SmTTG1, SmGL3 and SmTT8 in eggplant // Acta Horticult. Sin. 2014. V. 41. P. 2241.
 20. Jian W., Cao H., Yuan S., Liu Y., Lu J., Lu W., Li N., Wang J., Zou J., Tang N., Xu C., Cheng Y., Gao Y., Xi W., Bouzayen M., Li Z. SmMYB75, an MYB-type transcription factor, promotes anthocyanin accumulation and enhances volatile aroma production in tomato fruits // Hortic. Res. 2019. V. 6: 22.
<https://doi.org/10.1038/s41438-018-0098-y>
 21. Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N., Reshetnikova I.V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples // Russ. J. Plant Physiol. 2001. V. 48. P. 693.
 22. Hirakawa H., Shirasawa K., Miyatake K., Nunome T., Negoro S., Ohya A., Yamaguchi H., Sato S., Isobe S., Tabata S., Fukuoka H. Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the representative solanum species indigenous to the old world // DNA Res. 2014. V. 21. P. 649.
<https://doi.org/10.1093/dnares/dsu027>
 23. Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Никитинская Т.В., Яцевич К.К., Кильчевский А.В. Изучение полиморфизма генов МҮВ-факторов на основе сравнительной геномики овощных пасленовых культур (томат, перец, баклажан) для поиска ДНК-маркеров, дифференцирующих образцы по накоплению антоцианов // Доклады НАН Беларуси. 2019. Т. 63. С. 721.
 24. He Y., Li D., Li S., Liu Y., Chen H. SmBICs inhibit anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Plant Cell Physiol. 2021. V. 62. P. 1001.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcab070>
 25. Li L., Li S., Ge H., Shi S., Li D., Liu Y., Chen H. A light-responsive transcription factor SmMYB35 enhances anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Planta. 2021. V. 255: 12.
<https://doi.org/10.1007/s00425-021-03698-x>
 26. Li L., He Y., Ge H., Liu Y., Chen H. Functional characterization of SmMYB86, a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Plant Sci. 2021. V. 302: 110696.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110696>
 27. Wen J., Li Y., Qi T., Gao H., Liu B., Zhang M., Huang H., Song S. The C-terminal domains of Arabidopsis GL3/EGL3/TT8 interact with JAZ proteins and mediate dimeric interactions // Plant Signal Behav. 2018. V. 13: e1422460.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2017>
 28. Jensen E., Shafiei R., Ma X.F., Serba D.D., Smith D.P., Slavov G.T., Robson P., Farrar K., Jones S.T., Swaller T., Flavell R., Clifton-Brown J., Saha M.C., Donnison I. Linkage mapping evidence for a syntenic QTL associated with flowering time in perennial C4 rhizomatous grasses *Miscanthus* and switchgrass // Glob Change Biol. Bioenergy. 2021. V. 13. P. 98.
<https://doi.org/10.1111/gcbb.12755>
 29. Skorupa M., Gołębiewski M., Kurnik K., Niedojadło J., Kęsy J., Klamkowski K., Wójcik K., Treder W., Tretyn A., Tyburski J. Salt stress vs. salt shock - the case of sugar beet and its halophytic ancestor // BMC Plant Biol. 2019. V. 19: 57.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1661-x>
 30. Maalouf F., Abou-Khater L., Babiker Z., Jighly A., Alsamman A.M., Hu J., Ma Y., Risipail N., Balech R., Hamweih A., Baum M., Kumar S. Genetic dissection of heat stress tolerance in faba bean (*Vicia faba* L.) using GWAS // Plants. 2022. V. 11: 1108.
<https://doi.org/10.3390/plants11091108>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА РОСТ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ ЯЧМЕНЯ ПРИ РАЗНОМ СОДЕРЖАНИИ ЦИНКА В СУБСТРАТЕ

© 2023 г. А. А. Игнатенко^а *, Ю. В. Батова^а, Е. С. Холопцева^а, Н. М. Казнина^а

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

*e-mail: angelina911@ya.ru

Поступила в редакцию 03.11.2022 г.

После доработки 09.11.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

В условиях вегетационного опыта изучали влияние предпосевной обработки семян салициловой кислотой (СК) на параметры роста и фотосинтетического аппарата (ФСА) растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.), находящихся в оптимальных условиях минерального питания или при недостатке цинка в корнеобитаемой среде. Показано, что недостаток цинка не оказывает негативного влияния на ФСА, но вызывает торможение роста растений. Предпосевная обработка семян СК (10 мкМ) оказывала стимулирующее действие на интенсивность фотосинтеза и устьичную проводимость, что обеспечивало успешный рост растений в условиях недостатка цинка. При этом у растений, выращенных из обработанных СК семян, содержание цинка в корнях и побегах оказалось выше, чем у растений, чьи семена не были обработаны. На основании полученных результатов сделан вывод о возможности и перспективности применения предпосевной обработки семян СК для выращивания растений ячменя в условиях недостатка цинка в корнеобитаемой среде.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, недостаток цинка, предпосевная обработка семян, рост, салициловая кислота, фотосинтетический аппарат

DOI: 10.31857/S001533032370001X, EDN: ICABQM

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время около 50% территорий в мире, используемых для выращивания зерновых культур, характеризуются низким уровнем цинка в почве или низкой его доступностью для растений [1]. В России площади почв с низким и средним содержанием цинка составляют около 98% [2]. Вместе с тем, цинк является одним из наиболее важных микроэлементов для растений. Он служит кофактором целого ряда ферментов, участвующих в различных биохимических процессах, входит в структуру домена “цинковые пальцы”, которая имеется у многих транскрипционных факторов, а также выполняет целый ряд других функций в растительной клетке [3–6]. Известно, что дефицит цинка вызывает у растений замедление деления и растяжения клеток, нарушение структуры и функционирования мембран, ингибирование синтеза белка, замедление скорости фотосинтеза, торможение транспорта воды и минеральных веществ,

нарушение гормонального баланса. Все это, в конечном итоге, приводит к значительному снижению продуктивности растений [3, 4, 6], в связи с чем поиск возможных путей повышения устойчивости растений к дефициту данного микроэлемента является весьма актуальной задачей.

Одним из возможных способов решения упомянутой задачи является применение экзогенных регуляторов роста растений, которые характеризуются многофункциональностью своего действия, экологической безопасностью и низкими нормами расхода [7]. К одному из хорошо изученных в этом плане регуляторов роста относится соединение фенольной природы — салициловая кислота (СК). В растениях СК синтезируется из шикимовой кислоты и участвует в регуляции многих физиологических процессов, включая рост и развитие, фотосинтез, транспирацию, транспорт органических веществ и др. [8–10]. Помимо этого показано, что применение экзогенной СК способствует повышению устойчивости растений к различным абиотическим стрессорам [8, 11–14], в том числе к недостатку элементов минерального питания,

Сокращения: СК — салициловая кислота; ФСА — фотосинтетический аппарат.

что, например, было обнаружено в отношении фосфора [15], кальция [16] и железа [17, 18]. При этом защитную роль СК связывают с ее положительным влиянием на поглощение и баланс элементов минерального питания в растительном организме [19–21]. Следовательно, можно предположить, что СК будет способствовать повышению устойчивости растений и к дефициту цинка, однако экспериментальных данных, подтверждающих это, практически нет.

Цель работы — оценка влияния предпосевной обработки семян СК на устойчивость растений ячменя в условиях недостатка цинка в субстрате на основании изучения ряда показателей роста и фотосинтетического аппарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали растения ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Нур. Для выбора оптимальной концентрации СК был проведен предварительный опыт, в ходе которого семена ячменя замачивали на 24 ч в растворе СК с концентрацией 1, 10, 100, 300, 500 или 700 мкМ. Затем семена отмывали от СК, переносили в чашки Петри с дистиллированной водой и выдерживали в темноте при температуре 22°C 6 сут. В качестве контроля использовали растения, которые на протяжении всего опыта инкубировали в дистиллированной воде. Определяли энергию прорастания и всхожесть семян, а также анализировали влияние СК на начальный рост проростков. Для изучения биометрических показателей использовали корни растений, поскольку они более чувствительны к обработке экзогенными соединениями, включая фитогормоны. Концентрация СК, оказывающая наибольший стимулирующий эффект на изученные показатели, была использована для дальнейших исследований.

Для исследования влияния обработки семян СК на рост и фотосинтетический аппарат (ФСА) у растений ячменя, часть семян предварительно подвергалась обработке СК (24 ч на растворе с 10 мкМ СК; вариант опыта “СК”), часть оставалась необработанной (24 ч на дистиллированной воде; вариант опыта “без СК”). Проклюнувшиеся семена высаживали в сосуды с отмытым от примесей и прокаленным песком. Плотность посева составляла 12 растений на сосуд. Опыт проводили в вегетационных условиях. При этом часть растений на протяжении всего эксперимента поливали питательным раствором Хогланда-Арнона с оптимальной концентрацией цинка (2 мкМ) (Zn^{+} (контроль)), тогда как другую часть — питательным раствором без добавления соли цинка (Zn^{-} (опыт)).

Анализ растений проводили спустя 30 сут. после посева. Эффект предобработки семян СК оценивали по изменению показателей роста (длина корня,

высота побега, их сырая и сухая биомасса, длина и площадь четвертого листа) и ФСА (содержание фотосинтетических пигментов, потенциальная эффективность квантового выхода ФС II (F_v/F_m), устьичная проводимость, интенсивность фотосинтеза и транспирации). Определяли оводненность тканей побега, а также содержание цинка в корнях и побегах растений.

Энергию прорастания и всхожесть семян определяли на третьи и седьмые сутки, соответственно, согласно ГОСТ 12038-84 [22].

Площадь (cm^2) листа определяли по формуле $S = 2/3 \times l \times d$, где l — длина листовой пластинки, d — ширина листовой пластинки [23].

Для оценки накопления сырой и сухой биомассы растений их извлекали из песка, корни отделяли от побегов и очищали от частиц песка. Надземные и подземные органы растений взвешивали на весах сразу после отбора (сырая биомасса) и после высушивания при 105°C до постоянного веса (сухая биомасса).

Суммарное содержание хлорофиллов оценивали с помощью измерителя уровня хлорофилла SPAD 502 Plus (“Konica Minolta”, Япония) и выражали в условных единицах SPAD. Потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (F_v/F_m) измеряли после 20-мин. темновой адаптации листьев с использованием анализатора фотосинтеза с импульсно-модулированным освещением MINI-PAM (“Walz”, Германия).

Интенсивность фотосинтеза, транспирации и устьичную проводимость измеряли с использованием портативной системы для исследования CO_2 -газообмена и водяных паров HCM-1000 (“Walz”, Германия), соединенной с листовой камерой в контролируемых условиях освещенности, температуры и влажности воздуха.

Оводненность тканей корня и побега рассчитывали по формуле: оводненность = [(сырая масса — сухая масса)/сырая масса] $\times$ 100%.

Содержание цинка в корнях и побегах растений определяли ICP-MS методом с использованием масс-спектрометра с индуцированной плазмой (“Thermo Fisher Scientific”, Германия) по стандартной методике [24]. Представленные в таблице 4 значения являются результатом анализа смешанной пробы ($n = 12$).

Измерения параметров ФСА проводили на четвертом от основания побега листе — самом молодом из полностью закончивших рост.

Статистический анализ. При изучении морфометрических показателей анализировали по 12 растений каждого варианта. Биологическая повторность для физиологических параметров была 5-кратной. На рисунках и в таблицах приведены средние величины и их стандартные ошибки. Статистическую обработку данных осуществ-

Таблица 1. Влияние разных концентраций СК на энергию прорастания, всхожесть семян, длину корня и его сухую биомассу у растений ячменя сорта Нур

Концентрация СК, мкМ	Энергия прорастания, %	Всхожесть семян, %	Длина корня, см		Биомасса корня на 7 сут., мг
			3 сут.	7 сут.	
0 (контроль)	84 ± 2.19 ^{ab}	83 ± 3.21 ^{ab}	6.42 ± 0.08 ^b	12.83 ± 0.21 ^{bc}	6.22 ± 0.29 ^{bc}
1	83 ± 1.00 ^{ab}	82 ± 0.88 ^b	6.59 ± 0.08 ^{ab}	13.36 ± 0.20 ^{ab}	6.94 ± 0.23 ^{ab}
10	84 ± 1.53 ^{ab}	84 ± 0.58 ^{ab}	6.74 ± 0.07 ^a	13.68 ± 0.26 ^a	7.12 ± 0.23 ^a
100	87 ± 3.61 ^a	89 ± 1.00 ^a	6.46 ± 0.07 ^b	13.69 ± 0.23 ^a	6.88 ± 0.35 ^{ab}
300	83 ± 1.86 ^{ab}	80 ± 2.08 ^{bc}	6.11 ± 0.07 ^c	12.43 ± 0.24 ^c	5.83 ± 0.28 ^c
500	77 ± 4.58 ^{bc}	74 ± 5.36 ^{cd}	5.61 ± 0.07 ^d	11.55 ± 0.28 ^d	4.92 ± 0.32 ^d
700	71 ± 4.70 ^c	68 ± 5.84 ^d	4.69 ± 0.06 ^e	11.64 ± 0.22 ^d	4.89 ± 0.28 ^d

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между вариантами в пределах каждого столбца при $P < 0.05$.

Таблица 2. Влияние предпосевной обработки семян СК (10 мкМ) на рост растений ячменя сорта Нур

Показатель	Вариант			
	без СК		СК	
	Zn+ (контроль)	Zn- (опыт)	Zn+ (контроль)	Zn- (опыт)
Длина корня, см	10.13 ± 0.49 ^c	14.44 ± 0.69 ^a	9.40 ± 0.55 ^c	11.82 ± 0.56 ^b
Сырая биомасса корней, мг	476.92 ± 42.34 ^b	638.10 ± 61.33 ^a	584.25 ± 50.19 ^{ab}	694.75 ± 75.27 ^a
Сухая биомасса корней, мг	65.66 ± 7.59 ^b	83.84 ± 11.54 ^{ab}	85.34 ± 8.26 ^{ab}	99.32 ± 11.85 ^a
Высота побега, см	31.86 ± 0.88 ^a	29.04 ± 0.95 ^b	31.54 ± 0.58 ^a	31.70 ± 0.66 ^a
Сырая биомасса побега, мг	1131.12 ± 80.27 ^a	853.95 ± 71.23 ^b	1175.49 ± 85.23 ^a	1137.64 ± 93.98 ^a
Сухая биомасса побега, мг	191.86 ± 14.99 ^{ab}	148.11 ± 14.06 ^b	192.16 ± 13.31 ^a	196.19 ± 15.41 ^a

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между вариантами в пределах каждого показателя при $P < 0.05$.

ляли с использованием пакета статистического анализа в Microsoft Office Excel 2007 и PAST 4.0. Статистически значимо различающиеся величины каждого показателя (при $P < 0.05$) на рисунках и в таблицах обозначены разными латинскими буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние разных концентраций СК на энергию прорастания, всхожесть семян и начальный рост корня растений ячменя

В предварительных опытах было исследовано влияние суточной обработки СК в разных концентрациях (в диапазоне от 1 до 700 мкМ) на энергию прорастания и всхожесть семян ячменя, а также на начальный рост проростков. Установлено, что обработка семян СК в концентрациях 1, 10, 100 и 300 мкМ не оказывает влияния на энергию прорастания и всхожесть семян, тогда как повышение концентрации СК до 500 и 700 мкМ приводит к снижению этих показателей по отношению к контролю (табл. 1).

Обнаружено также, что СК в низких концентрациях либо не влияет на рост корня (1 мкМ),

либо оказывает стимулирующее действие на изученные ростовые показатели (10 и 100 мкМ), тогда как при использовании ее высоких концентраций (300, 500 и 700 мкМ) рост подземной части растений тормозится (табл. 1). Сравнение двух стимулирующих концентраций выявило более ранний (на третьи сутки) и более ярко выраженный эффект от применения СК в концентрации 10 мкМ. На основании полученных результатов для дальнейших исследований использовалась концентрация СК 10 мкМ.

Влияние обработки семян СК (10 мкМ) на рост и ФСА растений ячменя

Проведенные исследования позволили установить, что недостаток цинка в субстрате не оказывает негативного влияния на рост корней растений, семена которых перед посевом не были обработаны СК (вариант “без СК”). Так, в частности, у опытных растений (Zn-) длина корня и его сырая и сухая биомассы не снижались по отношению к контролю (Zn+). При этом показатели роста побега (высота, сырая и сухая биомассы побега) в этих условиях заметно уменьшались (табл. 2). Растения, выращенные из обработан-

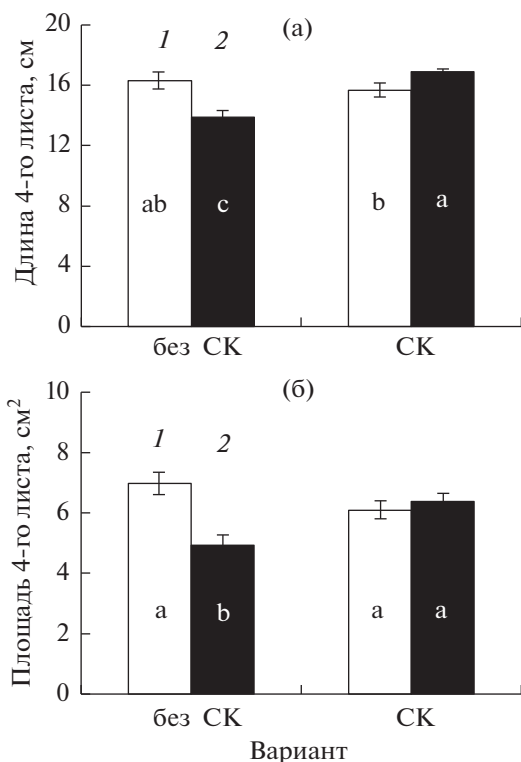


Рис. 1. Влияние предпосевной обработки семян СК (10 мкМ) на длину (а) и площадь (б) четвертого листа у растений ячменя сорта Нур. Варианты: 1 – Zn⁺ (контроль); 2 – Zn⁻ (опыт); без СК – семена не были обработаны СК; СК – семена были обработаны СК.

ных СК семян (вариант “СК”), оказались более устойчивыми к недостатку цинка, о чем свидетельствует отсутствие уменьшения (по сравнению с оптимальным содержанием цинка) показателей роста корня и побега.

Помимо замедления линейного роста побега, у растений в варианте “без СК” при недостатке цинка в корнеобитаемой среде было отмечено уменьшение (по сравнению с оптимальным уровнем металла) длины и площади листовой пластинки четвертого (самого молодого из полностью развернувшихся) листа (рис. 1). В отличие от этого, у растений варианта “СК” в условиях дефицита металла значимого снижения этих показателей не наблюдалось (рис. 1). Более того, длина листа у опытных растений (Zn⁻) была даже несколько больше, чем у контрольных (Zn⁺).

Отрицательного влияния недостатка цинка в субстрате на содержание хлорофиллов не наблюдалось ни в одном из вариантов опыта (табл. 3). Не было различий между вариантами и в величине показателя Fv/Fm, характеризующего квантовую эффективность фотосинтеза, что свидетельствует об отсутствии изменений в ФС II (табл. 3).

Известно, что скорость фотосинтеза у растений в стрессовых условиях во многом зависит от

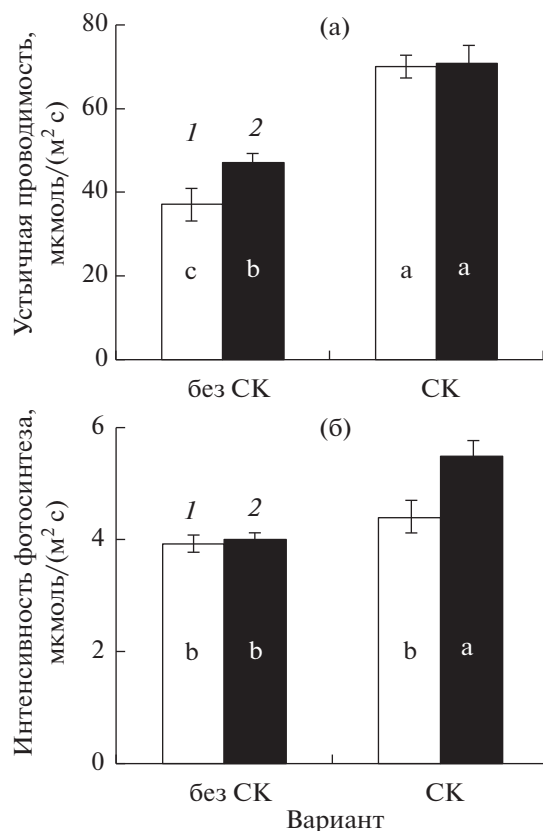


Рис. 2. Влияние предпосевной обработки семян СК (10 мкМ) на устьичную проводимость (а) и интенсивность фотосинтеза (б) у растений ячменя сорта Нур. Варианты: 1 – Zn⁺ (контроль); 2 – Zn⁻ (опыт); без СК – семена не были обработаны СК; СК – семена были обработаны СК.

степени открытия устьичной щели. В наших опытах при недостатке цинка в субстрате у растений, чьи семена не были обработаны СК, устьичная проводимость возрастала (по сравнению с контролем) (рис. 2а), при этом скорость фотосинтеза сохранялась на уровне контроля (рис. 2б). В варианте с предобработкой семян СК устьичная проводимость оказалась гораздо выше, чем в варианте “без СК”, причем как в оптимальных условиях минерального питания, так и при недостатке цинка (рис. 2а). При этом у опытных растений (Zn⁻) наблюдалось и некоторое увеличение скорости фотосинтеза (рис. 2б).

Ярко выраженного изменения интенсивности транспирации при недостатке цинка в корнеобитаемой среде по сравнению с его оптимальным содержанием в субстрате выявлено не было (рис. 3а). Однако у растений, чьи семена были обработаны СК, скорость этого процесса оказалась гораздо выше, чем у необработанных растений, причем как в стрессовых, так и в оптимальных условиях. Изменения оводненности тканей побега при этом не наблюдалось (рис. 3б).

*Влияние обработки семян СК (10 мкМ)
на содержание цинка в органах растений ячменя*

Химический анализ показал, что при недостатке цинка в субстрате содержание цинка в корнях и побегах растений ячменя заметно снижается (табл. 4). Обработка семян СК способствовала увеличению содержания металла в органах как в контрольном (Zn+), так и в опытном варианте (Zn-). В частности, содержание цинка в корнях и побегах растений варианта “СК” в оптимальных условиях минерального питания оказалось более, чем 2.5 и 3 раза выше, соответственно, чем у растений варианта “без СК”, а при недостатке цинка в корнеобитаемой среде – в 2.4 и 1.9 раза выше, соответственно (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время регуляторы роста природного и синтетического происхождения широко используются для повышения стрессоустойчивости и продуктивности растений [11, 25, 26]. При этом показано, что их эффективность зависит от целого ряда факторов, в том числе концентрации, способа и продолжительности обработки, а также вида растения и фазы его развития [11]. К настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии экзогенной СК на реакцию растений на действие неблагоприятных факторов биотической и абиотической природы, которая обобщена в целом ряде обзорных статей и монографий [8–11, 13, 14, 27]. В частности, выявлено, что это фенольное соединение повышает устойчивость растений к засолению, засухе, неблагоприятным тем-

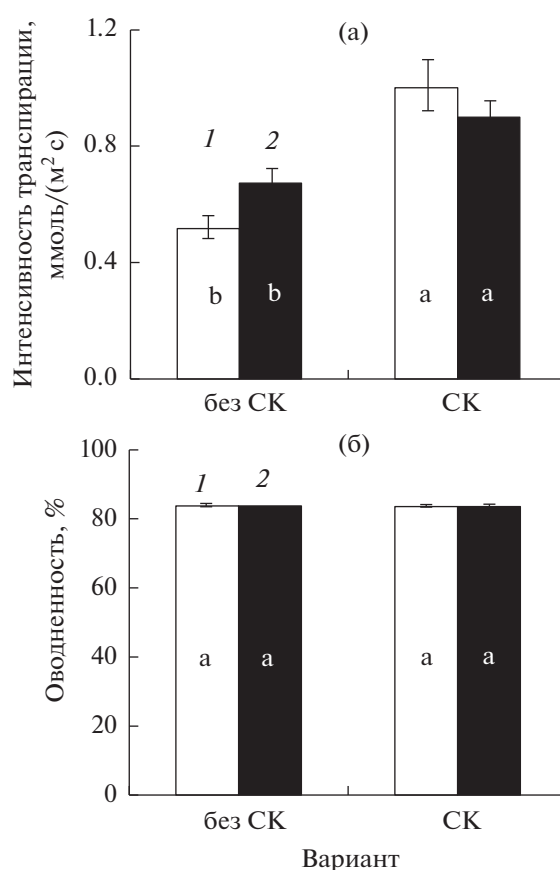


Рис. 3. Влияние предпосевной обработки семян СК (10 мкМ) на интенсивность транспирации (а) и оводненность тканей побега (б) у растений ячменя сорта Нур. Варианты: 1 – Zn+ (контроль); 2 – Zn- (опыт); без СК – семена не были обработаны СК; СК – семена были обработаны СК.

Таблица 3. Влияние предпосевной обработки семян СК (10 мкМ) на содержание хлорофиллов и потенциальный квантовый выход ФС II (Fv/Fm) у растений ячменя сорта Нур

Показатель	Вариант			
	без СК		СК	
	Zn+ (контроль)	Zn- (опыт)	Zn+ (контроль)	Zn- (опыт)
Содержание хлорофиллов, у.е. SPAD	42.62 ± 0.86 ^a	42.53 ± 1.00 ^a	43.61 ± 0.81 ^a	42.73 ± 0.69 ^a
Fv/Fm	0.822 ± 0.002 ^a	0.819 ± 0.002 ^{ab}	0.819 ± 0.002 ^{ab}	0.811 ± 0.004 ^b

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между вариантами в пределах каждого показателя при $P < 0.05$.

Таблица 4. Влияние предпосевной обработки семян СК (10 мкМ) на содержание цинка (ppm) в корнях и побегах ячменя сорта Нур

Вариант	Корень		Побег	
	Zn+ (контроль)	Zn- (опыт)	Zn+ (контроль)	Zn- (опыт)
Без СК	49.39 ± 7.13	28.05 ± 5.66	31.61 ± 4.82	17.09 ± 2.83
СК	126.67 ± 17.10	66.55 ± 9.36	95.15 ± 13.18	33.36 ± 6.35

пературам, высоким концентрациям тяжелых металлов, воздействию УФ и др. Участие же СК в адаптации растений к нарушению минерального питания, в том числе к недостатку цинка в корнеобитаемой среде, изучено крайне слабо.

В настоящем исследовании для изучения влияния СК на растения ячменя, находящиеся в условиях недостатка цинка в субстрате, использовалось предпосевное замачивание семян в растворе фитогормона. Судя по литературным данным, этот метод позволяет улучшить прорастание и всхожесть семян, а также способствует повышению устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессорам [9, 11, 14, 19, 27, 28]. Немаловажно и то, что этот метод считают экономически выгодным и экологически безопасным [26]. Однако использование метода предпосевной обработки семян требует подбора оптимальной концентрации СК, которая различна для каждого конкретного вида (и даже сорта). Проведенные нами предварительные опыты позволили установить, что наибольший стимулирующий эффект на прорастание, всхожесть семян и начальный рост проростков ячменя сорта Нур оказывала суточная обработка СК в концентрации 10 мкМ, которая и была использована в дальнейших исследованиях.

Опыты показали, что при недостатке цинка в субстрате у растений ячменя в варианте “без СК” заметно снижались (по сравнению с оптимальным уровнем минерального питания) высота побега, его биомасса и площадь листа. Торможение роста растений при их выращивании в условиях дефицита цинка — хорошо известно и может быть связано с замедлением деления, растяжения и дифференциации клеток [29], нарушением синтеза белков, углеводного и липидного обмена [6], изменением гормонального баланса [3], замедлением фотосинтетических процессов [30], повреждением структуры клеточных мембран [6, 30] и др. Обработка семян СК оказывала защитное действие на растения ячменя в стрессовых условиях, что проявлялось в поддержании процессов роста. Это согласуется с данными литературы. Так, например, ростстимулирующий эффект СК выявлен у ряда злаковых культур — у пшеницы при воздействии засухи [31], у ячменя — при засолении [32] и у риса — при обработке кадмием [33]. Активизация роста может быть обусловлена положительным влиянием СК на процесс деления клеток, что связано, например, с увеличением экспрессии ряда генов, участвующих в регуляции фаз клеточного цикла [34], с усилением фотосинтетической активности [10] и транспорта ассимилятов по тканям и органам растения [9]. Кроме того, обнаружено, что действие СК на рост растений может быть опосредовано ее влиянием на синтез, метаболизм и транспорт других фитогормонов, контролирующих рост, в частности, ауксинов [11].

Отрицательный эффект дефицита цинка на рост и развитие растений обычно объясняют замедлением фотосинтетических процессов. В частности, в этих условиях отмечено уменьшение содержания хлорофиллов, нарушение протекания реакций световой и темновой фаз фотосинтеза, снижение устьичной проводимости и замедление скорости ассимиляции углерода [30, 35]. Однако в наших опытах при недостатке цинка в корнеобитаемой среде скорость фотосинтеза у растений, чьи семена не были обработаны СК, не снижалась, что, отчасти, было связано с поддержанием уровня фотосинтетических пигментов, отсутствием нарушений в ФС II, а также увеличением устьичной проводимости. У растений варианта “СК” в этих условиях скорость фотосинтеза возрастала. Как показывают исследования, повышение интенсивности этого процесса после применения СК может быть обусловлено рядом причин, а именно, увеличением устьичной проводимости, уровня фотосинтетических пигментов, скорости транспорта электронов и активности ферментов темновых реакций фотосинтеза. Так, например, замачивание семян кукурузы в СК способствовало тому, что в условиях избытка кадмия у растений на более высоком уровне (по сравнению с контролем) поддерживалось содержание хлорофиллов, а также скорость ассимиляции CO_2 , что было связано с двукратным повышением активности РУБИСКО и фосфоенолпируваткарбоксилазы [28, 36]. Обработка проростков риса способствовала повышению фотохимической активности фотосистем и увеличению потока электронов от Q_A к пластохинону, что существенно уменьшало негативное действие ионов тяжелых металлов на ФСА растений [33]. Нельзя не учитывать и участие СК в поддержании целостности мембран, в том числе мембран тилакоидов, что также обеспечивает сохранение необходимой интенсивности фотосинтетических процессов в неблагоприятных условиях окружающей среды [33].

О влиянии недостатка цинка на водный обмен растений сведений крайне мало. В основном указывается, что при ярко выраженном его дефиците замедляется интенсивность транспирации, что в значительной степени связано с частичным закрытием устьичной щели [35]. Что же касается сведений об изменении этого процесса в ответ на обработку СК, то они довольно противоречивы. Ряд авторов указывает на уменьшение интенсивности транспирации и закрытие устьиц при воздействии на растения СК [9, 37], тогда как другие, наоборот, наблюдали ее увеличение [38, 39]. В наших опытах недостаток цинка в субстрате не вызывал существенного изменения интенсивности транспирации в варианте “без СК”, тогда как у растений варианта “СК” отмечалось значительное повышение скорости транспирации, причем как в оптимальных условиях (Zn^{+}), так и в стрессовых (Zn^{-}).

Полученные нами данные по содержанию цинка в органах растений свидетельствуют о том, что обработка семян СК способствует усилению поглощения цинка корнями и его перемещения в побеги. Возможно, именно этим объясняется стимулирующий эффект СК на ряд показателей ФСА. Ранее уже указывалось положительное воздействие СК на поступление элементов минерального питания в растения. Например, у растений кукурузы, подвергнутых засолению, при применении СК увеличивалось содержание Cu и Mn, что, по крайней мере, отчасти, оказывало положительное влияние на рост растений и накопление ими сухого вещества [19]. Обработка СК арахиса, выращиваемого при недостатке железа в субстрате, вызывала увеличение его содержания в листьях и корнях [17], а у растений риса, испытывающих дефицит фосфора, СК способствовала повышению уровня этого элемента в ксилеме и усиливала экспрессию генов транспортеров, осуществляющих его перемещение из корней в побеги [15]. Показано также, что обработка СК (замачивание семян или опрыскивание растений) в условиях дефицита железа или засоления увеличивала содержание цинка в листьях или корнях кукурузы [19], арахиса [17] и огурца [40]. Однако механизмы положительного влияния СК на поглощение и транспорт микроэлементов не до конца изучены.

Таким образом, предпосевная обработка семян СК повышает устойчивость растений ячменя к недостатку цинка в корнеобитаемой среде. Во многом это связано с повышением содержания цинка в корнях и побегах растений, что способствует более активному протеканию фотосинтетических процессов и, как следствие, поддержанию роста и накоплению биомассы в этих условиях. Полученные результаты свидетельствуют о возможности и перспективности применения предпосевной обработки семян СК для выращивания растений ячменя в условиях недостатка цинка в корнеобитаемой среде.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-26-00168, <https://rscf.ru/project/22-26-00168/>). В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cakmak I., Torun B., Erenoğlu B., Öztürk L., Marschner H., Kalayci M., Ekiz H., Yilmaz A. Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency // *Euphytica*. 1998. V. 100. P. 349.
2. Сычев В.Г., Аристархов А.Н., Харитонова А.Ф., Толстоусов В.П., Ефимова Н.К., Бушуев Н.Н. Интенсификация продукционного процесса растений микроэлементами. Приемы управления. М.: Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии имени Д.Н. Прянишникова, 2009. 520 с.
3. Alloway B.J. Zinc in Soil and Crop Nutrition. 2nd Edition. Brussels: International Zinc Association; Paris: International Fertilizer Industry Association. 2008. 139 p.
4. Казнина Н.М., Тумов А.Ф. Влияние дефицита цинка на физиологические процессы и продуктивность злаков // *Успехи современной биологии*. 2019. Т. 139. С. 280.
<https://doi.org/10.1134/S0042132419030037>
5. Ali A., Bhat B.A., Rather G.A., Malla B.A., Ganie S. Proteomic studies of micronutrient deficiency and toxicity // *Plant Micronutrients. Deficiency and toxicity management* / Eds. T. Aftab, K.R. Hakeem. Springer. 2022. P. 257.
6. Khan S.T., Malik A., Alwarthan A., Shaik M.R. The enormity of the zinc deficiency problem and available solutions; an overview // *Arabian J. Chem*. 2022. V. 15. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103668>
7. Рябчинская Т.А., Зимица Т.В. Средства, регулирующие рост и развитие растений, в агротехнологиях современного растениеводства // *Агрохимия*. 2017. Т. 12. С. 62.
8. Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease // *Annu. Rev. Phytopathol*. 2009. V. 47. P. 177.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
9. Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review // *Environ. Exp. Bot*. 2010. V. 68. P. 14.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005>
10. Janda T., Gondor O.K., Yordanova R., Szalai G., Pal M. Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects // *Acta Physiol. Plant*. 2014. V. 36. P. 2537.
<https://doi.org/10.1007/s11738-014-1620-y>
11. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
12. Horvath E., Szalai G., Janda T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling // *J. Plant Growth Regul*. 2007. V. 26. P. 290.
<https://doi.org/10.1007/s00344-007-9017-4>
13. Khan M.I.R., Fatma M., Per T.S., Anjum N.A., Khan N.A. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants // *Front. Plant Sci*. 2015. V. 6.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00462>
14. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Поляков А.К., Дмитриев А.П. Салициловая кислота и формирование адаптивных реакций растений на абиотические стрессоры: роль компонентов сигнальной сети // *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2021. Т. 55. С. 135.
<https://doi.org/10.17223/19988591/55/8>
15. Wu Q., Jing H.-K., Feng Z.-H., Huang J., Shen R.-F., Zhu X.-F. Salicylic acid acts upstream of auxin and nitric oxide (NO) in cell wall phosphorus remobilization in phosphorus deficient rice // *Rice*. 2022. V. 15.
<https://doi.org/10.1186/s12284-022-00588-y>
16. Su T., Yu S., Yu R., Zhang F., Yu Y., Zhang D., Zhao X., Wang W. Effects of endogenous salicylic acid during calcium deficiency-induced tipburn in chinese cabbage

- (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) // Plant Mol. Biol. Rep. 2016. V. 34. P. 607.
<https://doi.org/10.1007/s11105-015-0949-8>
17. Kong J., Dong Y., Xu L., Liu S., Bai X. Effects of foliar application of salicylic acid and nitric oxide in alleviating iron deficiency induced chlorosis of *Arachis hypogaea* L. // Bot. Stud. 2014. V. 55.
<https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-9>
 18. Shen C., Yang Y., Liu K., Zhang L., Guo H., Sun T., Wang H. Involvement of endogenous salicylic acid in iron-deficiency responses in Arabidopsis // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 4179.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw196>
 19. Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Cicek N., Guneri E., Eraslan F., Guzelordu T. Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) // Arch. Agron. Soil Sci. 2005. V. 51. P. 687.
<https://doi.org/10.1080/03650340500336075>
 20. Khan N.A., Syeed S., Masood A., Nazar R., Iqbal N. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress // Inter. J. Plant Biol. 2010. V. 1.
<https://doi.org/10.4081/pb.2010.e1>
 21. Wang C., Zhang S., Wang P., Hou J., Qian J., Ao Y., Lu J., Li L. Salicylic acid involved in the regulation of nutrient elements uptake and oxidative stress in *Vallisneria spiralis* (Lour.) Hara under Pb stress // Chemosphere. 2011. V. 84. P. 136.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.026>
 22. ГОСТ 12038-84. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Дата введения: 1986-07-01. М.: Изд-во стандартов.
 23. Аникиев В.В., Кутузов Ф.Ф. Новый способ определения площади листовой поверхности у злаков // Физиология растений. 1961. Т. 8. С. 375.
 24. Светов С.А., Степанова А.В., Чаженгина С.Ю., Светова Е.Н., Рыбникова З.П., Михайлова А.И., Парамонов А.С., Утицына В.Л., Эхова М.В., Колодей В.С. Прецезионный (ICP-MS, LA-ICP-MS) анализ состава горных пород и минералов: методика и оценка точности результатов на примере раннедокембрийских мафитовых комплексов // Труды КарНЦ РАН. Сер. Геология докембрия. 2015. № 7. С. 54.
 25. Тутов А.Ф., Таланова В.В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2009. 206 с.
 26. Rhaman M.S., Imran S., Rauf F., Khatun M., Baskin C.C., Murata Y., Hasanuzzaman M. Seed priming with phytohormones: an effective approach for the mitigation of abiotic stress // Plants. 2021. V. 10.
<https://doi.org/10.3390/plants10010037>
 27. Per T.S., Fatma M., Asgher M., Javied S., Khan N.A. Salicylic acid and nutrients interplay in abiotic stress tolerance // Salicylic acid: A multifaceted hormone / Eds. R. Nazar, N. Iqbal, N.A. Khan. Springer. 2017. P. 221.
 28. Krantev A., Yordanova R., Janda T., Szalai G., Popova L. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 920.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.11.014>
 29. Hossian B., Hirata N., Nagatomo Y., Akashi R., Takaki H. Internal zinc accumulation is correlated with increased growth in rice suspension culture // J. Plant Growth Reg. 1997. V. 16. P. 239.
 30. Chen W., Yang X., He Z., Feng Y., Hu F. Differential changes in photosynthetic capacity, 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress // Physiol. Plantarum. 2008. V. 132. P. 89.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00992.x>
 31. Yavas I., Unay A. Effects of zinc and salicylic acid on wheat under drought stress // JAPS. 2016. V. 26. P. 1012.
 32. Pirasteh-Anosheh H., Ranjbar G., Hasanuzzaman M., Khanna K., Bhardwa R., Ahmad P. Salicylic acid-mediated regulation of morpho-physiological and yield attributes of wheat and barley plants in deferring salinity stress // J. Plant Growth Regul. 2022. V. 41. P. 1291.
<https://doi.org/10.1007/s00344-021-10358-7>
 33. Yotsova E.K., Dobrikova A.G., Stefanov M.A., Kouzmanova M., Apostolova E.L. Improvement of the rice photosynthetic apparatus defence under cadmium stress modulated by salicylic acid supply to roots // Theor. Exp. Plant Physiol. 2018. V. 30. P. 57.
<https://doi.org/10.1007/s40626-018-0102-9>
 34. Xu L., Zhao H., Ruan W., Deng M., Wang F., Peng J., Luo J., Chen Z., Yib K. ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM1 functions in salicylic acid biosynthesis to maintain proper reactive oxygen species levels for root meristem activity in rice // The Plant Cell. 2017. V. 29. P. 560.
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00665>
 35. Wang H., Liu R.L., Jin J.Y. Effects of zinc and soil moisture on photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameters of maize // Biol. Plantarum. 2009. V. 53. P. 191.
<https://doi.org/10.1007/s10535-009-0033-z>
 36. Khan W., Prithviraj B., Smith D.L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 485.
<https://doi.org/10.1078/0176-1617-00865>
 37. Liu C., Guo J., Cui Y., Lü T., Zhang X., Shi G. Effects of cadmium and salicylic acid on growth, spectral reflectance and photosynthesis of castor bean seedlings // Plant Soil. 2011. V. 344. P. 131.
<https://doi.org/10.1007/s11104-011-0733-y>
 38. Husen A., Iqbal M., Sohrab S.S., Ansari M.K.A. Salicylic acid alleviates salinity caused damage to foliar functions, plant growth and antioxidant system in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Br.) // Agric. Food Secur. 2018. V. 7. P. 44.
<https://doi.org/10.1186/s40066-018-0194-0>
 39. Sedaghat M., Tahmasebi Sarvestani Z., Emamb Y., Mokhtassi Bidgol A., Sorooshzadeh A. Foliar-Applied GR24 and salicylic acid enhanced wheat drought tolerance // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 733.
<https://doi.org/10.1134/S1021443720040159>
 40. Yildirim E., Turan M., Guven I. Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll, and mineral content of cucumber grown under salt stress // J. Plant Nutr. 2008. V. 31. P. 593.
<https://doi.org/10.1080/01904160801895118>

УДК 581.1

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ЗАСУХЕ С ПОМОЩЬЮ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *Bacillus subtilis*

© 2023 г. З. М. Курамшина^а, *, Р. М. Хайруллин^б

^аСтерлитамакский филиал Уфимского университета науки и технологий, Стерлитамак, Россия

^бИнститут биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.22 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Изучено влияние засухи на растения *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., *Bromopsis inermis* L., инокулированные эндофитными штаммами бактерий *B. subtilis*. Показано, что обработка эндофитами повышает устойчивость растений к данному неблагоприятному фактору, стимулирует их рост, подавляет развитие окислительного стресса. Обработка растений изученными эндофитными штаммами *B. subtilis*, способными проявлять антистрессовый эффект и усиливать активность антиоксидантной системы может быть использована для выращивания сельскохозяйственных культур в засушливых условиях.

Ключевые слова: сельскохозяйственные растения, эндофиты *B. subtilis*, засуха, антиоксидантные ферменты, малоновый диальдегид, пролин, антистрессовый эффект

DOI: 10.31857/S0015330322600760, **EDN:** IBTMOJ

ВВЕДЕНИЕ

Среди абиотических стрессов дефицит воды рассматривается как один из наиболее тяжелых факторов, препятствующих росту и развитию различных растений. Прогнозируется, что засуха станет в ближайшие годы распространенным явлением во многих регионах мира из-за уменьшения количества осадков и увеличения испарения воды вследствие глобального изменения климата [1, 2]. Воздействие засухи сильно сказывается на сельском хозяйстве, так как независимо от видов выращиваемых культурных растений, их качество и урожайность напрямую зависят от наличия влаги в почве. Ситуация усугубляется истощением доступных водных ресурсов и увеличением спроса на продовольствие из-за роста населения [1–3].

Последствия засухи проявляются у растений на морфологическом, физиологическом, биохимическом и молекулярном уровнях. Засуха влияет на все фенологические стадии роста растений. Семена не могут прорасти при недостатке воды, поскольку для прорастания семян требуется достаточное ее количество. Деление и удлинение клеток — систематические процессы, протекающие одновременно с ростом растений, затормаживаются при нехватке воды. Стресс, возникающий при засухе, значительно уменьшает урожайность важных сельскохозяйственных культур [1, 2].

Одной из первых реакций растения на засуху является закрытие устьиц и уменьшение концентрации CO₂, подавление фотосинтеза, что потенциально может привести к гибели растительного организма при сильном стрессе [4–6]. Длительное воздействие засухи разрушает хлоропласты и гранулы крахмала, что напрямую влияет на фотохимическую активность и снижает скорость транспирации растения [3, 5, 7].

Дефицит воды влияет на усвоение корнями минеральных веществ, таких как азот, фосфор, кремний, кальций, магний и др., их транспортировку к побегам, что может привести к снижению роста и развития [7].

В условиях засухи в растениях происходят глубокие изменения в обмене веществ, резко увеличивается образование активных форм кислорода (АФК), таких как супероксидные радикалы, перекись водорода и гидроксильные радикалы, что приводит к окислительному стрессу [3, 5, 8]. При высоких концентрациях АФК происходит перекисное окисление липидов, разрушение мембран, деградация белков, липидов и нуклеиновых кислот [8].

Негативные последствия абиотических стрессов, в частности засухи, могут быть успешно преодолены ростостимулирующими бактериями (PGPB), естественными обитателями ризосферы

растений. Большинство таких бактерий обладают способностью улучшать рост и повышать продуктивность с.-х. культур благодаря активации синтеза в растительных клетках аминокислот и фитогормонов, фиксации азота, а также увеличению доступного количества минеральных веществ [7, 8]. Использование RGPB в качестве биоудобрений представляет собой дешевый и экологически чистый способ стимуляции роста и развития растений в условиях засухи, что позволяет отнести такие микроорганизмы к важным и необходимым инструментам в растениеводстве [7, 8].

Важным фактором эффективности применения ростостимулирующих бактерий является их способность колонизировать различные виды сельскохозяйственных культур [7]. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ на засухоустойчивость растений *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., *Bromopsis inermis* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объектами исследования служили яровая мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорта Омская 35, кукуруза (*Zea mays* L.) сорта РИК-340, горох (*Pisum sativum* L.) сорта Чишминский 95, кострец безостый (*Bromopsis inermis* L.). Эксперименты проводили в лабораторных условиях. Семена перед посевом промывали в мыльной воде, стерилизовали 96%-ым этанолом в течение 1 мин, трижды ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали [9].

В экспериментах использовали бактерии *B. subtilis* штамма 26Д (коллекция ВНИИСХМ, №128) и штамма 11ВМ (ВНИИСХМ, №519). Семена обрабатывали в ламинарном боксе 20-часовой культурой бактерий, выращенной на мясопептонном агаре при +37°C. Клетки бактерий отмывали раствором 0.001 М КСl. Суспензию клеток доводили до необходимой концентрации по оптической плотности. Расход бактериальной суспензии (10^6 кл/мл) составлял 20 мкл на 1 г семян. Обработанные семена выдерживали в течение часа, затем использовали в экспериментах. Контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой.

Инокулированные и контрольные семена выращивали в вегетационных сосудах (20×20 см) при температуре 18–20°C при искусственной равномерной освещенности (среднесуточный световой интеграл 200–250 мкмоль / ($\text{м}^2 \text{с}$)) и 16-часовом фотопериоде. В качестве субстрата для выращивания растений использовали чернозем выщелоченный (верхний гумусовый слой).

После посева семян в почву ее поливали дистиллированной водой до влажности 70% от предельной полевой влагоемкости (ППВ), которую определяли по ГОСТ 53764-2009 [10]. После по-

явления всходов контрольные растения поливали, поддерживая исходную влажность. Стресс имитировали уменьшением влажности почвы, при котором начинали визуально проявляться симптомы увядания листьев. Определение влажности такой почвы выявило значение на уровне 30% от ППВ. Для биохимических исследований на 30 сут отбирали только побеги.

Получение экстрактов из растительных тканей. Побеги растений промывали в дистиллированной воде, удаляли избыток воды фильтровальной бумагой, взвешивали. Растительный материал гомогенизировали в 0.1 М К-фосфатном буфере pH 6.0 (при определении пероксидазы) или в Трис-содержащем буфере pH 7.8 (при определении каталазы и малонового альдегида) в соотношении навеска (г) : экстрагент (мл) — 1 : 10, центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин, центрифугировали 10 мин при 3500 g (СМ-50, “Elmi”, Латвия). Надосадочную жидкость центрифугировали еще 10 мин при 15300 g и использовали для определения активности ферментов и малонового диальдегида.

Определение активности ферментов и содержания малонового диальдегида. Активность пероксидазы оценивали согласно методике Хайруллина с соавторами, исходя из количества окисленного ортофенилендиамина (“Sigma”, США) [11], и определяли по формуле (1):

$$A = D_{492} / (mt), \quad (1)$$

где A — активность в единицах; D_{492} — оптическая плотность раствора окисленного ортофенилендиамина в единицах показания спектрофотометра; m (мг) — сырая масса растительного материала; t (с) — время от начала и до остановки реакции добавлением 0.05 N раствора серной кислоты.

Значение m определяли по формуле (2):

$$m = M(V_o/V_s) \quad (2)$$

где M — масса образца растительного материала для получения экстракта; V_o (мл) — объем образца, взятого для анализа активности пероксидазы; V_s — объем экстракта всей растительной ткани, взятой в анализ. Соответственно, единица активности равнялась единице оптической плотности.

Активность каталазы определяли согласно методике Королюк с соавторами [12]. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Активность каталазы определяли по формуле, приведенной выше (1), соответственно измеряя оптическую плотность D при длине волны 410 нм. Содержание МДА измеряли, используя метод Costa с соавторами, основанный на образовании окрашенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой при нагрева-

Таблица 1. Морфометрические показатели растений пшеницы сорта Омская 35 и костреца безостого при разной влажности почвы.

Вариант	<i>Triticum aestivum</i> L.		<i>Bromus inermis</i> L.	
	70% ППВ	30% ППВ	70% ППВ	30% ППВ
Длина побегов, см				
Без обработки	38.9 ± 3.3	28.8 ± 2.2	20.14 ± 2.0	12.7 ± 1.1
<i>B. subtilis</i> 26Д	40.6 ± 2.3	32.3 ± 3.1	22.6 ± 2.3	14.5 ± 1.1
<i>B. subtilis</i> 11 ВМ	40.0 ± 1.9	32.0 ± 3.0	27.2 ± 2.6	16.4 ± 1.3
Масса побега г				
Контроль без обработки	26.8 ± 1.9	16.0 ± 0.9	6.6 ± 0.4	3.4 ± 0.7
<i>B. subtilis</i> 26Д	32.0 ± 1.0	18.8 ± 0.07	6.7 ± 0.3	3.6 ± 0.1
<i>B. subtilis</i> 11 ВМ	31.0 ± 0.9	18.3 ± 0.06	7.1 ± 0.3	4.5 ± 0.2
Масса корней, г				
Контроль без обработки	5.0 ± 0.3	2.6 ± 0.2	3.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1
<i>B. subtilis</i> 26Д	5.3 ± 0.2	3.8 ± 0.05	4.1 ± 0.2	1.5 ± 0.05
<i>B. subtilis</i> 11 ВМ	5.2 ± 0.1	3.9 ± 0.04	5.7 ± 0.1	1.5 ± 0.04

нии [13]. Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводили на спектрофотометре Unico 2800 (“United products and Instruments”, США).

Определение содержания свободного пролина. Экстракцию и определение свободного пролина проводили по модифицированной методике Шихалеевой с соавт. [14], используя кислый нингидриновый реактив, приготовленный без нагревания (1.25 г нингидрина (“Acros organics”, Бельгия) растворяли в 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл 6 М раствора H_3PO_4). Навеску свежей листовой пластины (200 мг) заливали 20 мл кипящей дистиллированной воды и выдерживали 10 мин на водяной бане при температуре 100°C. Затем в пробирку заливали 2 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл нингидринового реактива и добавляли 2 мл приготовленного экстракта. Пробы инкубировали 20 мин на водяной бане при температуре 100°C, после чего быстро охлаждали до комнатной температуры на лед. Измеряли оптическую плотность продуктов реакции при длине волны 520 нм. Содержание пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя в качестве стандарта пролин компании “Sigma” (США) [14].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных программ пакета Microsoft Office, данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Достоверность различий между средними определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние засухи на рост растений. Исследования показали, что при нехватке воды угнетается рост растений, как необработанных, так и обработанных бактериями. Так, у инокулированных бактериями растений пшеницы, костреца, гороха и кукурузы длина надземной части была меньше на 25.9, 36.8, 54.4 и 36.4%, соответственно, в сравнении с растениями, растущими при нормальном увлажнении (не испытывающих стресс) (табл. 1, 2). Биомасса побегов пшеницы, костреца, гороха и кукурузы при засухе была меньше, чем у контрольных растений на 40.2, 48.8, 15.0 и 50.0% соответственно. Биомасса корней указанных культур уменьшилась на 48.0, 66.6, 44.7 и 51.6% соответственно (табл. 1, 2).

При отсутствии стресс-фактора длина надземной части растений пшеницы, костреца, гороха и кукурузы, семена которых были инокулированы клетками бактерий *B. subtilis* 26Д была больше, чем у контрольных на 4.3, 12.2, 7.2 и 16.5% соответственно, а при обработке семян клетками *B. subtilis* 11ВМ — на 2.8, 30.5, 5.22 и 11.6% соответственно. Инокуляция семян бактериями положительно сказывалась и на показателях биомассы побегов и корней исследованных растений. У обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д растений пшеницы, костреца, гороха и кукурузы масса побегов была больше, чем у необработанных на 19.4, 1.4, 6.5 и 12.8%, масса корней — на 6.0, 13.8, 6.5 и 7.6% соответственно. Инокуляция семян клетками эндофита *B. subtilis* 11ВМ увеличивала массу побегов в сравнении с необработанными указанными выше растениями, соответственно, на 15.6, 7.5, 4.9 и 12.1%. Масса корней у растений пшеницы, кост-

Таблица 2. Влияние обработки семян эндофитами на морфометрические показатели растений гороха и кукурузы при имитации почвенной засухи.

Вариант	<i>Pisum sativum</i> L.		<i>Zea mays</i> L.	
	70% ППВ	30% ППВ	70% ППВ	30% ППВ
Длина побегов, см				
Контроль без обработки	40.2 ± 2.2	18.3 ± 1.1	41.2 ± 2.1	26.2 ± 1.2
<i>B. subtilis</i> 26Д	43.1 ± 1.2	25.7 ± 1.9	48.0 ± 1.1	27.2 ± 1.2
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	42.3 ± 1.6	24.9 ± 1.8	46.0 ± 1.8	28.5 ± 1.8
Масса побега, г				
Контроль без обработки	1.83 ± 0.06	1.55 ± 0.03	1.40 ± 0.10	0.70 ± 0.03
<i>B. subtilis</i> 26Д	1.95 ± 0.05	1.64 ± 0.02	1.58 ± 0.05	0.76 ± 0.02
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.92 ± 0.09	1.60 ± 0.03	1.57 ± 0.1	0.79 ± 0.09
Масса корня, г				
Контроль без обработки	0.38 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.91 ± 0.03	0.44 ± 0.02
<i>B. subtilis</i> 26Д	0.35 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.98 ± 0.02	0.50 ± 0.09
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	0.37 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.94 ± 0.04	0.56 ± 0.07

реца и кукурузы, семена которых были инокулированы этим эндофитом, увеличивалась на 4.0, 58.3 и 3.2% в сравнении с не испытывающими стресс контрольными растениями, соответственно. Интересно, что масса корней инокулированных бактериями *B. subtilis* 11ВМ растений гороха, растущих во влажной почве, была меньше на 2.6% в сравнении с необработанными растениями, растущими в почве с влажностью 70% от ППВ (табл. 1, 2).

В условиях имитации почвенной засухи у обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д и 11ВМ растений пшеницы длина надземной части была больше, чем у необработанных растений на 12.2 и 11.1%, у костреца безостого — на 14 и 29%, у гороха — на 40 и 36%, у кукурузы — на 3.9 и 8.8%. Одновременно с этим инокуляция растений бактериями увеличивала и массу органов. У обработанных бактериями штаммов 26Д и 11ВМ растений пшеницы масса надземной части была больше, чем у необработанных на 17.5 и 14.3%, у костра безостого — на 5.8 и 32.3%, у гороха — на 5.8 и 3.2%, у кукурузы — на 8.5 и 12.8% соответственно (табл. 1, 2).

Масса корней растений, обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д и 11ВМ была больше, чем у необработанных растений: у пшеницы — на 46.1 и 50%, у костреца — на 25 и 20.8%, у гороха — на 71.4 и 47.6%, у кукурузы — на 13.6% и 27.3% соответственно (табл. 1, 2).

Влияние засухи на активность антиоксидантных ферментов и уровень МДА. При имитации засухи (30% ППВ) активность каталазы в побегах необработанных проростков пшеницы достоверно не отличалась от показателей необработанных растений, выросших при оптимальном увлажнении; у костреца и кукурузы имела недостоверная в эксперименте тенденция к увеличению (на 33.3 и

28.5%, соответственно), а у растений гороха увеличивалась в 2.1 раза (рис. 1).

Обработка семян бактериями *B. subtilis* 26Д у растений пшеницы и костреца способствовала повышению активности каталазы при оптимальном увлажнении (70% от ППВ), не влияла на этот показатель у растений кукурузы, а у растений гороха наблюдалась недостоверная тенденция к снижению уровня активности. При использовании клеток штамма 11ВМ активность каталазы в обработанных и необработанных растениях пшеницы, растущих на влажной почве, была практически одинаковой, в то время как в тканях растений других культур достоверно повышалась (у костреца, кукурузы и гороха на 16.5, 62.4, 74.4% соответственно).

В условиях имитации засухи у растений пшеницы и кукурузы, обработанных клетками эндофита *B. subtilis* 26Д активность каталазы увеличивалась на 46.5 и 88.8%, соответственно, в сравнении с необработанными растениями, выросшими также в условиях засухи. Такой же ответ повышения активности каталазы в условиях засухи проявлялся у растений пшеницы, инокулированных клетками штамма 11ВМ. В остальных вариантах опыта обработка семян костреца, гороха и кукурузы бактериями исследованных штаммов приводила к падению уровня активности фермента в тканях инокулированных бактериями растений, растущими при почвенной засухе, в сравнении с неинокулированными растениями, также испытывающими стресс (рис. 1).

Активность пероксидазы в тканях побегов растений, обработанных эндофитом *B. subtilis* 26Д и растущих при увлажнении почвы 70% от ППВ достоверно увеличивалась в тканях костреца (на 62.7%), а при использовании клеток штамма 11ВМ

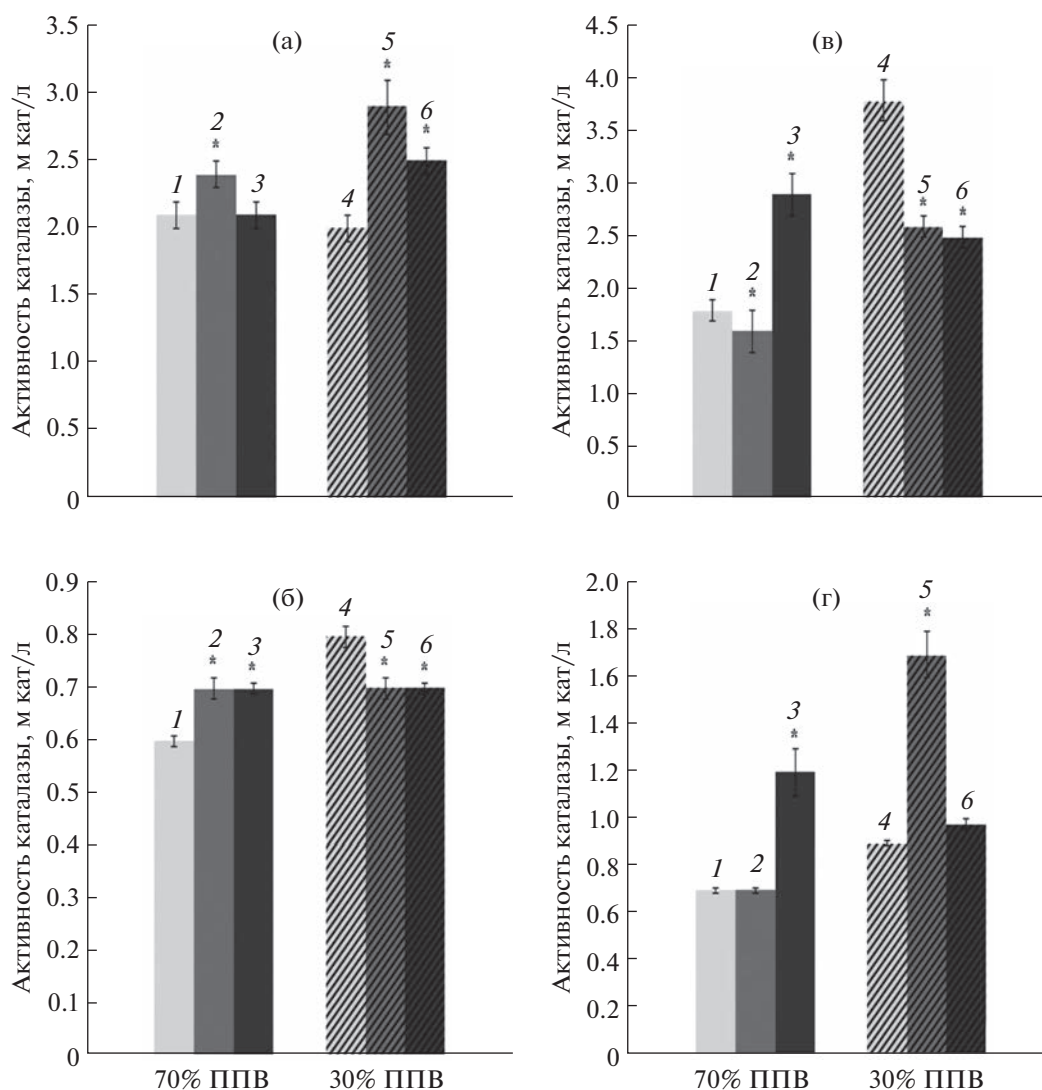


Рис. 1. Влияние обработки семян клеточной суспензией эндофитных штаммов бактерий на активность каталазы в побегах 30-дневных растений в условиях засухи: (а) пшеница, (б) коострец, (в) горох, (г) кукуруза. (*) Различия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений при разной степени влажности почвы достоверны при $P \leq 0.05$. 1 – без обработки 70% ППВ; 2 – *B. subtilis* 26Д 70% ППВ; 3 – *B. subtilis* 11ВМ 70% ППВ; 4 – без обработки 30% ППВ; 5 – *B. subtilis* 26Д 30% ППВ; 6 – *B. subtilis* 11ВМ 30% ППВ.

и в тканях пшеницы, коостреца и гороха на 15.0, 91.2 и 14.1% соответственно (рис. 2). Интересно, что обработка семян кукурузы клетками обоих штаммов приводила к существенному снижению уровня активности этого фермента в тканях побегов, в сравнении с контрольными растениями, растущими во влажной почве.

У инокулированных бактериями *B. subtilis* 11ВМ растений пшеницы, коостреца и гороха, растущих в почве с влажностью 30% от ППВ, активность пероксидазы достоверно увеличивалась на 5.2, 20.3 и 11.1%, в то время как в тканях кукурузы, наоборот, достоверно уменьшалась (рис. 2). В условиях засухи обработка семян пшеницы и кукурузы клетками бактерий *B. subtilis* 26Д не влияла на

активность фермента в тканях побегов в сравнении с контрольными растениями, растущими в таких же условиях, а при выращивании растений коостреца и кукурузы уровень активности этого фермента в тканях побегов был ниже, в сравнении с контрольными культурами, испытывающими аналогичный стресс.

Уровень МДА в тканях побегов растений пшеницы и коостреца, инокулированных бактериями двух штаммов, и гороха, обработанных клетками эндофита *B. subtilis* 26Д, не изменился по сравнению с контрольными необработанными растениями, растущими в почве с влажностью 70% от ППВ, а у растений кукурузы достоверно был ниже, чем в контроле (рис. 3). При инокуляции се-

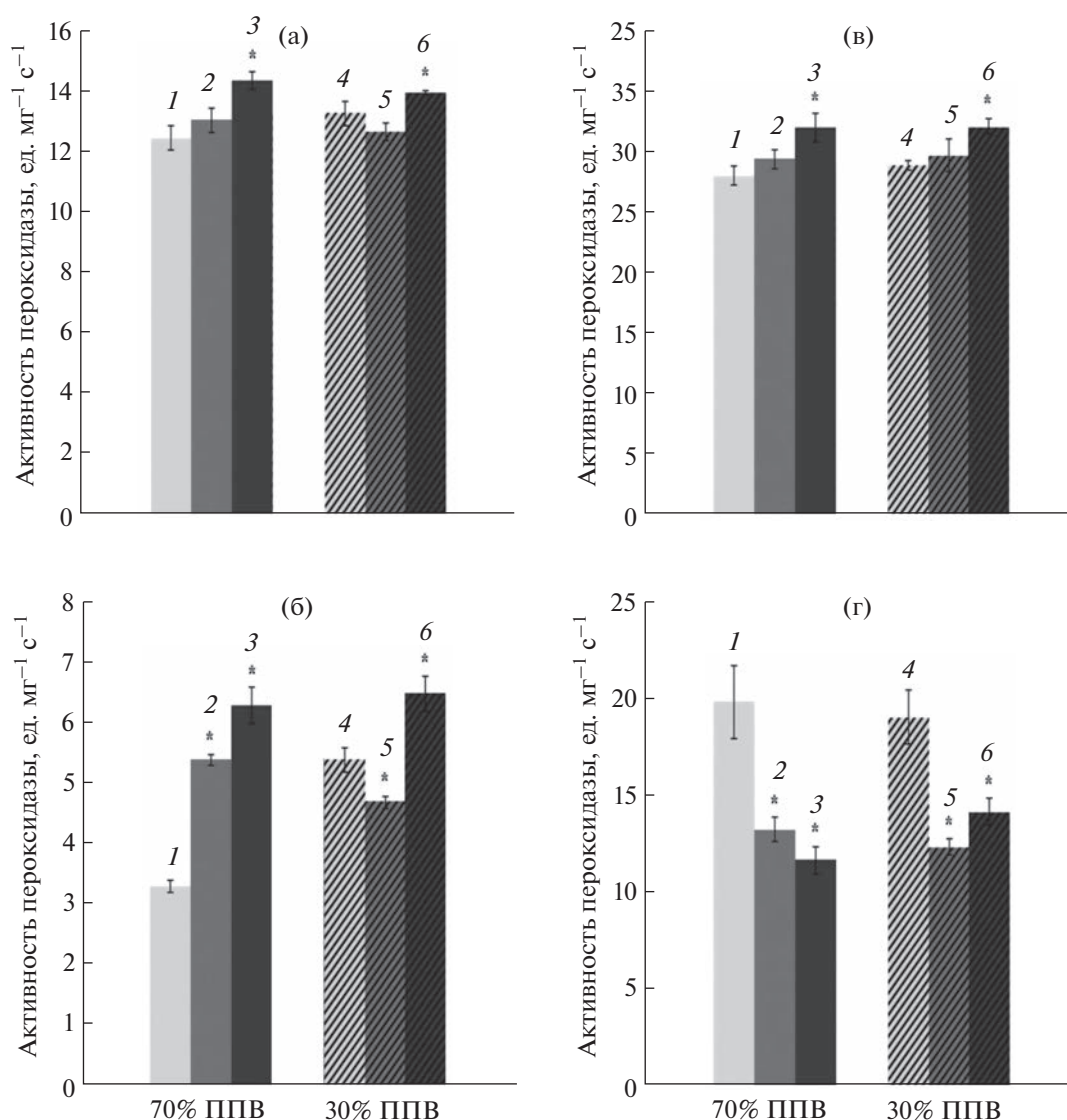


Рис. 2. Изменения активности пероксидазы в побегах 30-дневных растений в условиях имитации засухи: (а) пшеница, (б) кострец, (в) горох, (г) кукуруза. (*) Различия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений при разной степени влажности почвы достоверны при $P \leq 0.05$. 1 – без обработки 70% ППВ; 2 – *B. subtilis* 26Д 70% ППВ; 3 – *B. subtilis* 11ВМ 70% ППВ; 4 – без обработки 30% ППВ; 5 – *B. subtilis* 26Д 30% ППВ; 6 – *B. subtilis* 11ВМ 30% ППВ.

мян гороха клетками эндوفита *B. subtilis* 11ВМ содержание МДА в тканях надземной части растений статистически значимо повысилось по отношению к таковому неинокулированных растений.

При действии почвенной засухи содержание МДА повышалось в тканях побегов как необработанных, так и инокулированных бактериями растений пшеницы и гороха, в сравнении с показателями в тканях культур, растущих в контрольной почве (70% влажности от ППВ), соответственно. Однако по сравнению с неинокулированными растениями, растущими в условиях засухи, содержание МДА в тканях инокулированных эндوفитами обоих штаммов было меньше. В условиях почвенной засухи уровень МДА повышался также в тка-

нях необработанных растений костреца и гороха, в сравнении с необработанными культурами растущими в контрольной почве. При этом инокуляция семян этих растений клетками как бактерий *B. subtilis* 26Д, так и 11ВМ способствовала снижению уровня МДА в сравнении с необработанными растениями, подвергнутых действию стресса.

Влияние стресса на уровень пролина. Содержание пролина в побегах инокулированных клетками *B. subtilis* штамма 26Д или 11ВМ растений пшеницы, растущих как во влажной почве, так и при дефиците влаги было больше в сравнении с неинокулированными (рис. 4). В условиях засухи это превышение было больше, в сравнении с аналогичным показателем в тканях растений, расту-

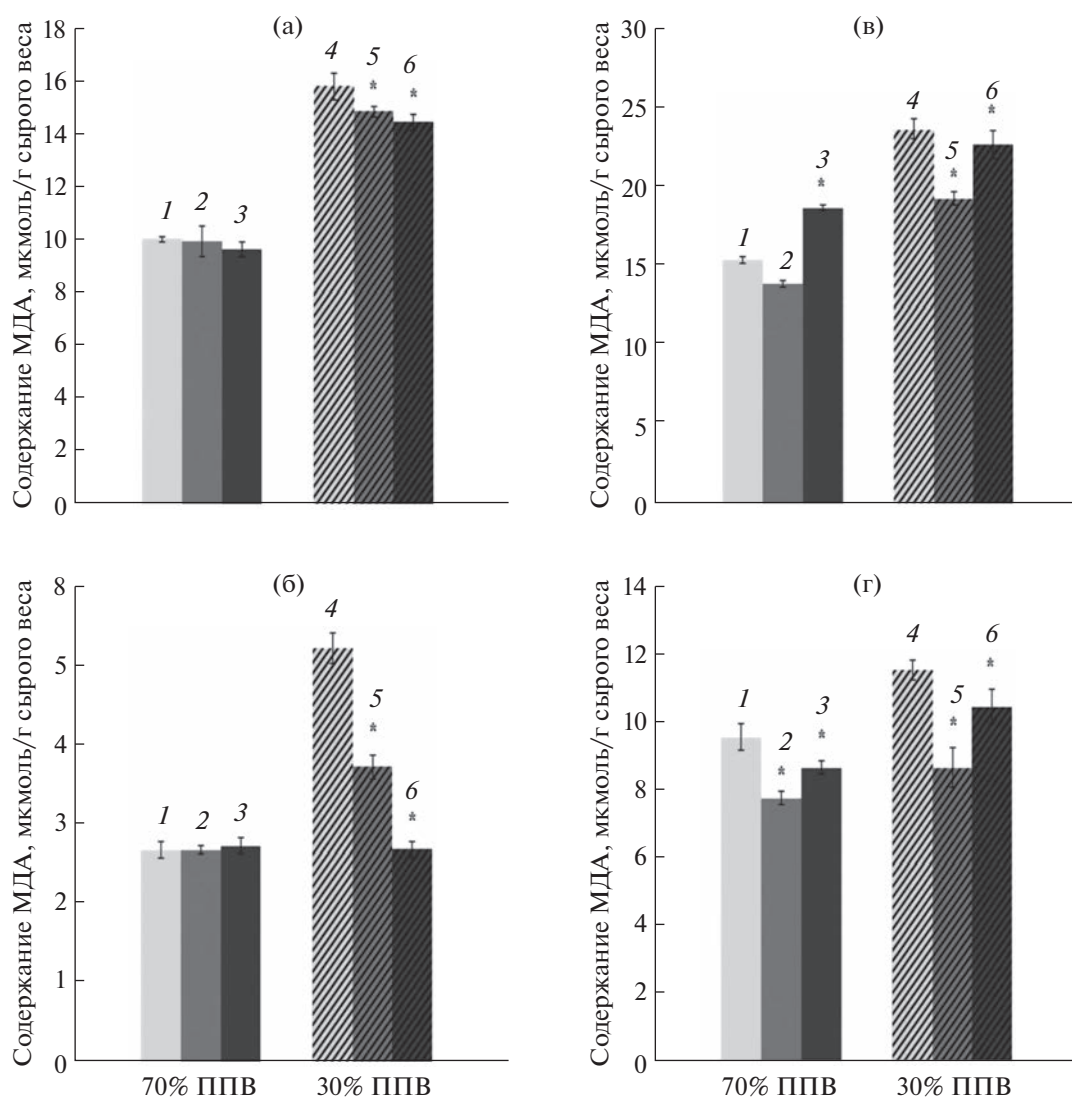


Рис. 3. Влияние эндофитных штаммов *B. subtilis* на содержание МДА в побегах 30-дневных растений в условиях засухи: (а) пшеница, (б) кострец, (в) горох, (г) кукуруза. (*) Различия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений при разной степени влажности почвы достоверны при $P \leq 0.05$. 1 – без обработки 70% ППВ; 2 – *B. subtilis* 26Д 70% ППВ; 3 – *B. subtilis* 11ВМ 70% ППВ; 4 – без обработки 30% ППВ; 5 – *B. subtilis* 26Д 30% ППВ; 6 – *B. subtilis* 11ВМ 30% ППВ.

щих в контрольной почве. При действии засухи содержание пролина практически не менялось в контрольных, необработанных бактериями тканях побегов костреца в сравнении с растениями, растущими в контрольной почве. В стрессовых условиях содержание пролина в тканях обработанных бактериями растений достоверно увеличилось в сравнении с необработанными, выросшими также в условиях почвенной засухи. Обработка семян гороха клетками бактерий штамма 26Д не влияла на содержание пролина в тканях надземной части растений, выросших во влажной почве, а обработка штаммом 11ВМ способствовала достоверному увеличению в сравнении с необработанными растениями. Стресс привел к мно-

гократному увеличению содержания пролина в тканях побегов как контрольных, необработанных растений, так и инокулированных бациллами в сравнении с растениями, растущими в почве влажностью 70% от ППВ. При этом у обработанных бактериями стрессированных растений содержание этой аминокислоты было в среднем на 50% больше в сравнении с необработанными. Так же, как и у растений костреца, при действии засухи содержание пролина практически не менялось в контрольных необработанных бактериями тканях побегов кукурузы в сравнении с растениями, растущими в контрольной почве. Аналогичная картина наблюдалась и при инокуляции растений эндофитом штамма 26Д. При действии засухи уро-

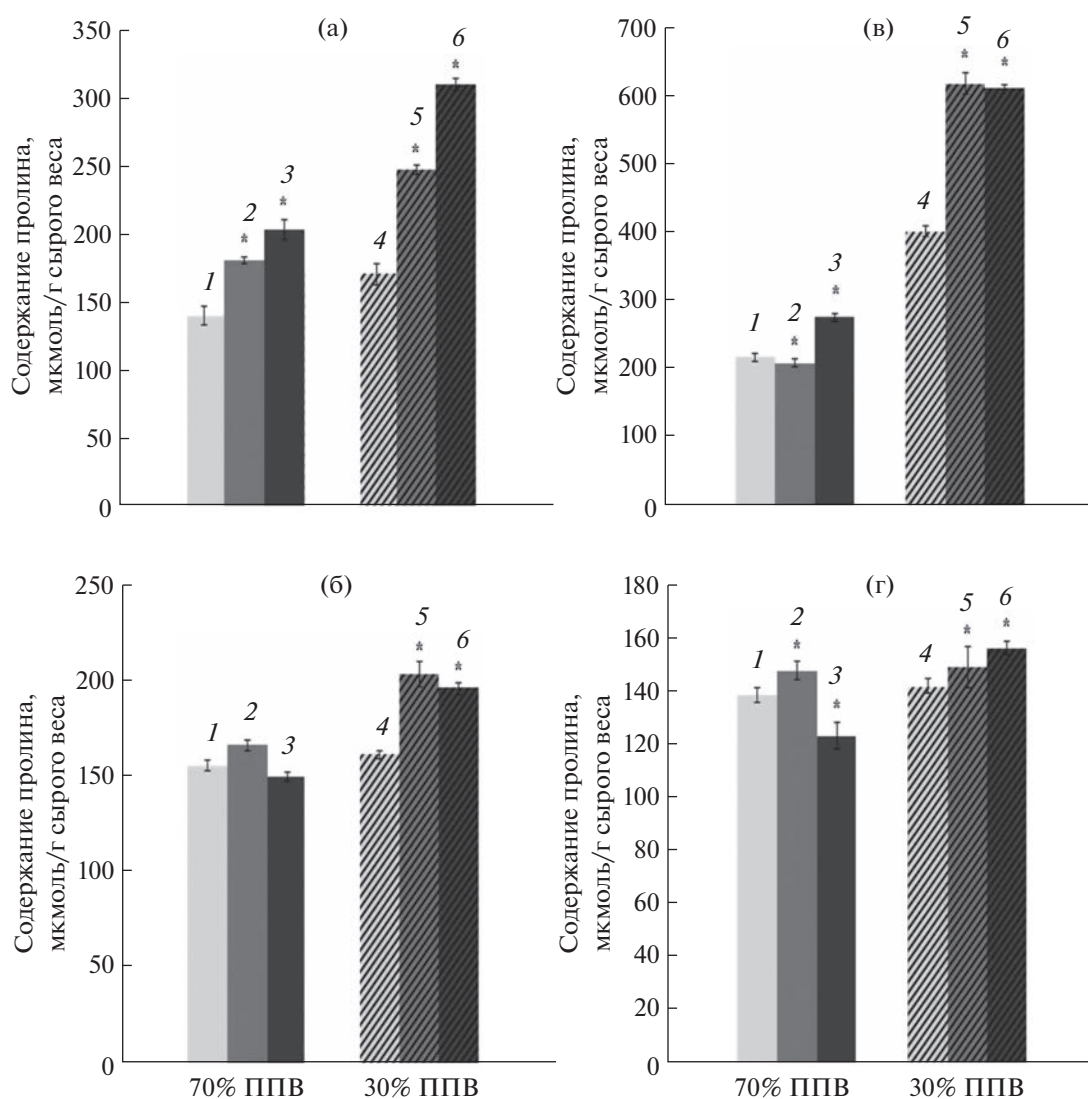


Рис. 4. Содержание пролина в побегах 30-дневных растений в условиях засухи: (а) пшеница, (б) кострец, (в) горох, (г) кукуруза. (*) Различия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений при разной степени влажности почвы достоверны при $P \leq 0.05$. 1 – без обработки 70% ППВ; 2 – *B. subtilis* 26Д 70% ППВ; 3 – *B. subtilis* 11ВМ 70% ППВ; 4 – без обработки 30% ППВ; 5 – *B. subtilis* 26Д 30% ППВ; 6 – *B. subtilis* 11ВМ 30% ППВ.

вень содержания пролина повышался в тканях побегов кукурузы, обработанных бактериями штамма 11ВМ в сравнении как с контрольными обработанными и не подвергшимися стрессу растениями, так и со стрессированными необработанными.

Корреляционный анализ выявил, что содержание пролина положительно коррелировало с длиной побегов ($r = 0.8247$, $P < 0.01$), массой побегов ($r = 0.7700$, $P < 0.01$) и корней ($r = 0.8985$, $P < 0.01$) растений, использованных в эксперименте независимо от их вида.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подавление роста и уменьшение биомассы растений при недостатке воды в почве наблюдалось

как у необработанных, так и у обработанных бактериями *B. subtilis* растений, однако у инокулированных эндофитами растений показатели были больше в сравнении с неинокулированными. Известно, что бактерии обоих исследованных штаммов способны продуцировать различные биологически активные вещества, в том числе и фитогормоны (ИУК), улучшать минеральное питание растений благодаря растворению фосфатов, что, вероятно, лежит в основе выявленного нами протекторного эффекта этих эндофитов [1–8].

Следует отметить, что несмотря на то, что оба штамма проявляли антистрессовый эффект на рост растений, степень ответной реакции по морфометрическим показателям у исследованных культур была разной, как при действии стресса, так и без

него. Так, при достаточном увлажнении растения *B. inermis* сильнее отзывались на обработку бактериями штамма 11ВМ, а растения *Z. mays* были одинаково отзывчивы на действия как одного, так и другого эндофита. В отсутствии стресс-фактора показатели стимуляции роста растений гороха были меньше в сравнении с другими культурами, однако в условиях засухи картина была противоположной: разница в длине побегов и биомассы корней инокулированных бактериями растений гороха в сравнении с неинокулированными была больше относительно аналогичных показателей у трех остальных культур, при этом стимуляция роста гороха под влиянием клеток штамма 26Д была выражена сильнее, чем под действием бактерий штамма 11ВМ. Эффект влияния обработки семян на рост растений пшеницы и коостреца в условиях стресса в сравнении с его отсутствием был примерно одинаков не зависимо от штамма. Протекторный эффект на рост растений кукурузы в условиях стресса сильнее проявлялся при обработке семян бактериями штамма 11ВМ. Эти данные согласуются с ранее сформулированным нами выводом о видовой (и сортовой) отзывчивости растений на обработку бактериями [18, 19]. Полученные результаты помогают определить эффективность бактериализации семян разных видов культур, а также наиболее подходящие эндофитные штаммы бактерий.

Известно, что засуха, как стрессовый фактор, приводит к накоплению АФК, образующихся, в основном, в хлоропластах, и, в некоторой степени, в митохондриях, что вызывает окислительный стресс, связанный с воздействием на молекулярные и клеточные структуры супероксид-анион радикала (O_2^-), гидроксильного радикала (ОН), синглетного кислорода (1O_2), перекиси водорода (H_2O_2) и других соединений. Потеря целостности и функции клеточной мембраны, как полагают, непосредственно коррелирует с массовым накоплением АФК при засухе [20, 21]. Детоксифицировать окислительный стресс растения могут различными антиоксидантами, которые уменьшают степень окислительного повреждения и придают засухоустойчивость, например, благодаря активации таких ферментов, как пероксидаза, каталаза и др. [20–22]. Известно также, что при слабой и средней степени засухи активность антиоксидантных систем повышается, а при дальнейшем увеличении силы стресса наблюдается уменьшение активности защитных ферментов [20–24].

Повышение активности каталазы в условиях засухи наблюдалось в тканях растений пшеницы, инокулированных бактериями любого из изученных штаммов, тогда как растения гороха не реагировали по этому показателю в сравнении с неинокулированными. Активность пероксидазы была выше в стрессированных растениях пшеницы, коостреца и гороха лишь при инокуляции клетка-

ми бактерий штамма 11ВМ в сравнении с неинокулированными растениями, растущими также в условиях засухи. Интересно, что обработка семян кукурузы привела к снижению активности этого фермента в тканях побегов при стрессе в сравнении с контрольными растениями.

Содержание МДА, являющегося конечным продуктом перекисного окисления липидов клеточных мембран и одним из важных признаков их повреждения [20–23] при действии стресса, в отсутствие инокуляции семян увеличивалось в тканях побегов всех исследованных растений. Однотипная общая закономерность меньшего содержания МДА в тканях стрессированных и инокулированных растений в сравнении с такими же стрессированными, но неинокулированными растениями позволяет на основании совокупности указанных данных сделать вывод об уровне этого соединения в растительных тканях, как интегрального показателя, свидетельствующего как о действии стресса, так и о протекторном эффекте эндофитов, независимо от штамма, а также о повышении при этом засухоустойчивости, подтвержденной морфометрическими показателями.

Таким же интегральным показателем протекторного эффекта, как и в случае анализа содержания МДА, может быть количественный уровень пролина в тканях надземной части растений, который при стрессе был выше в побегах всех исследованных культур, в сравнении с неинокулированными растениями. Известно, что пролин участвует в стабилизации белков, мембран и субклеточных структур при действии стрессов и может служить фактором уменьшения уровня АФК, что позволяет растениям противостоять засухе [21–23].

Итак, из четырех исследованных биохимических показателей содержание МДА и пролина может служить достаточно четким показателем для скрининга микробиологических препаратов на способность повышать устойчивость растений к обезвоживанию.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bijalwan P., Sharma M., Kaushik P. Review of the effects of drought stress on plants: a systematic approach // Preprints. 2022. 2022020014. <https://doi.org/10.20944/preprints202202.0014.v1>
2. Wu C., Wang T. Evaluating cumulative drought effect on global vegetation photosynthesis using numerous GPP products // Front. Environ. Sci. 2022. V. 10: 908875. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.908875>
3. Vidal C., González F., Santander C., Pérez R., Gallardo V., Santos C., Aponte H., Ruiz A., Cornejo P. Management

- of rhizosphere microbiota and plant production under drought stress: A Comprehensive Review // *Plants*. 2022. V. 11: 2437. <https://doi.org/10.3390/plants11182437>
4. Verma H., Kumar D., Kumar V., Kumari M., Singh S.K., Sharma V.K., Droby S., Santoyo G., White J.F., Kumar A. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants // *Microorganisms*. 2021. V. 9: 1729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081729>
 5. Poudel M., Mendes R., Costa L.A.S., Bueno C.G., Meng Y., Folimonova S.Y., Garrett K.A., Martins S.J. The role of plant-associated bacteria, fungi, and viruses in drought stress mitigation // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12: 743512. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743512>
 6. Abideen Z., Cardinale M., Zulfiqar F., Koyro H.-W., Rasool S.G., Hessini K., Darbali W., Zhao F., Siddique K.H.M. Seed endophyte bacteria enhance drought stress tolerance in *Hordeum vulgare* by regulating, physiological characteristics, antioxidants and minerals uptake // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 3: 980046. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.980046>
 7. Verma H., Kumar D., Kumar V., Kumari M., Singh S.K., Sharma V.K., Droby S., Santoyo G., White J.F., Kumar A. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants // *Microorganisms*. 2021. V. 9: 1729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081729>
 8. Fadji A.E., Santoyo G., Yadav A.N., Babalola O.O. Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13: 962427. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962427>
 9. Bezrukova M.V., Lubyanova A.R., Fatkhutdinova R.A. The involvement of wheat and common bean lectins in the control of cell division in the root apical meristems of various plant species // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011. V. 58. P. 174.
 10. ГОСТ Р 53764-2009. Качество почвы. Определение содержания почвенной влаги в виде объемной доли с применением трубок для отбора пробы грунта. Гравиметрический метод. Москва: Стандартинформ, 2010. 6с. <https://files.stroyinf.ru/Index2/1/4293823/4293823118.htm>
 11. Khairullin R.M., Yarullina L.G., Troshina N.B., Akhmetova I.E. Chitoooligosaccharide-induced activation of o-phenylenediamine oxidation by wheat seedlings in the presence of oxalic acid // *Biochemistry (Moscow)*. 2001. V. 66. P. 286.
 12. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело*. 1988. № 1. С. 16.
 13. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // *Plant Sci.* 2002. V. 162. P. 939.
 14. Шихалеева Г.Н., Будняк А.К., Шихалеев И.И., Иващенко О.Л. Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2014. Вип. 21. № 1112. С. 168.
 15. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohc в агроэкосистемах. Москва: Наука, 2007. 147 с.
 16. Egorshina A.A., Luk'yantsev M.A., Khairullin R.M., Sakhabutdinova A.R. Involvement of phytohormones in the development of interaction between wheat seedlings and endophytic *Bacillus subtilis* strain 11BM // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012. V. 59. P. 134.
 17. Bogati K., Walczak M. The Impact of Drought Stress on Soil Microbial Community, Enzyme Activities and Plants // *Agronomy*. 2022. V. 12: 189. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010189>
 18. Кураמיшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. Видовая отзывчивость сельскохозяйственных культур на инокуляцию семян клетками эндофитных бактерий *B. subtilis* // *Научная жизнь*. 2019. Т. 14. С. 279. <https://doi.org/10.26088/INOB.2019.91.29682>
 19. Кураמיшина З.М., Хайруллин Р.М., Смирнова Ю.В. Сортная отзывчивость *Triticum aestivum* L. на инокуляцию клетками эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* // *Российская сельскохозяйственная наука*. 2019. № 6. С. 3. <https://doi.org/10.31857/S2500-2627201963-6>
 20. Abdelaal K., AlKahtani M., Attia K., Hafez Y., Király L., Künstler A. The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants // *Biology*. 2021. V. 10: 520. <https://doi.org/10.3390/biology10060520>
 21. Ebrahimi M., Zamani G.R., Alizadeh Z. Antioxidant activity: a strategy for alleviating the effects of drought on *Calendula officinalis* L. // *European Journal of Medicinal Plants*. 2016. V. 15. P. 1. <https://www.researchgate.net/publication/305450047>
 22. Alharbi K., Rashwan E., Hafez E., Omara A.E.-D., Mohamed H.H., Alshaal T. Potassium Humate and Plant Growth-Promoting Microbes Jointly Mitigate Water Deficit Stress in Soybean Cultivated in Salt-Affected Soil // *Plants*. 2022 V. 11: 3016. <https://doi.org/10.3390/plants11223016>
 23. Cruz C., Cardoso P., Santos J., Matos D., Figueira E. Bioprospecting soil bacteria from arid zones to increase plant tolerance to drought: growth and biochemical status of maize inoculated with plant growth-promoting bacteria isolated from sal island, cape verde // *Plants*. 2022. V. 11: 2912. <https://doi.org/10.3390/plants11212912>
 24. Zhang L., Zhang W., Li Q., Cui R., Wang Z., Wang Y., Zhang Y.-Z., Ding W., Shen X. Deciphering the root endosphere microbiome of the desert plant *Alhagi sparsifolia* for drought resistance-promoting bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86: e02863-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02863-19>

УДК 581.1

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО АРКТИЧЕСКОГО ШТАММА КАРОТИНОГЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Halochlorella rubescens* NAMSU SBB-20

© 2023 г. А. А. Зайцева^а, *, Д. А. Бахарева^а, П. А. Зайцев^а, Е. С. Лобакова^а

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

*e-mail: annakublanovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 12.12.2022 г.

Зеленые микроводоросли, способные к накоплению вторичных каротиноидов, являются важнейшими объектами биотехнологии, а поиск новых штаммов с уникальными свойствами, в частности, приспособленных к росту при низких температурах и повышенной солености в среде – актуальной задачей. Штамм микроводоросли NAMSU SBB-20 выделен из альго-бактериальной биопленки, обнаруженной на побережье Белого моря в зоне литорали на Соловецком архипелаге. Идентификация штамма показала его принадлежность к виду *Halochlorella rubescens* P.J.L. Dangeard. Вид *H. rubescens* впервые описан для акватории Белого моря. В условиях высокой интенсивности света показаны ультраструктурные изменения клеток, среди которых отмечены деструкция фотосинтетического аппарата, формирование цитоплазматических и хлоропластных липидных включений. Показано, что в неблагоприятных для роста условиях культура штамма NAMSU SBB-20 способна приобретать оранжевую окраску. Проведена оценка влияния состава среды и интенсивности освещения на пигментный состав водоросли. Наибольшие абсолютные значения накопления каротиноидов отмечены при культивировании на свету интенсивностью 150 мкмоль квантов ФАР/м²/с на средах BG-11, не содержащих источника фосфора (15.66 ± 0.18 мг/л) или азота (15.95 ± 0.56 мг/л). Описанный штамм обладает биотехнологическим потенциалом ввиду изначальной галотолерантности и накопления высоких значений вторичных каротиноидов в биомассе.

Ключевые слова: *Halochlorella rubescens*, арктический регион, каротиногенные микроводоросли, липидные включения, пигменты, электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0015330322600735, EDN: IBRXKH

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли (оксигенные фототрофные микроорганизмы) широко применяются в различных областях биотехнологии. В первую очередь они являются продуцентами ряда эссенциальных для человека и животных веществ, например, каротиноидов и длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот [1–3]. На данный момент в промышленности применяются в основном такие виды каротиногенных микроводорослей, как *Haematococcus lacustris* (Girod-Chantrons) Rostafinski [2] и *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco [1], используемые для получения астаксантина и β-каротина, соответственно. Для штаммов, применяемых в биотехнологии, известны сниженная продуктивность и склонность к контаминации, что указывает на необходимость поиска новых штаммов продуцентов кето-каротиноидов и/или ксантофиллов и подходов к оптимизации процессов их

культивирования (в частности, приводящих к увеличению продукции каротиноидов) [3]. Технология промышленного культивирования оксигенных фотоавтотрофных микроорганизмов в открытых системах культивирования (прудах высокой интенсивности культивирования, high rate algal ponds (HRAPs)) налажена, в основном, в странах с теплым климатом, таких как Израиль, США (южные штаты), Индия, Австралия и др. [1]. Температурные режимы средних и северных широт России не подходят для культивирования известных на данный момент штаммов микроводорослей в открытых системах, несмотря на достаточное количество естественного освещения в северных регионах в течение полярного дня. Разработка технологий культивирования штаммов, выделенных из арктических регионов, в частности с побережья Белого моря [4] позволит выращивать высокопродуктивные штаммы оксигенных фототрофных

микроорганизмов в условиях пониженных температур и использовать в качестве среды культивирования морскую воду. Микроводоросль штамма NAMSU SBB-20 была выделена из зоны литорали побережья Белого моря бухты Благополучия (о. Большой Соловецкий, Архангельская обл., Россия) в 2020 году. Соловецкие острова относятся к Арктическому региону России, средняя годовая температура воздуха на них составляет 1.1°C.

Ранее из Арктического региона (Кандалакшский залив Белого моря) были выделены штаммы каротиногенных микроводорослей, среди которых представители рр. *Haematococcus*, *Bracteacoccus* и *Coelastrella*. Показано, что данные штаммы способны к накоплению как исключительно астаксантина (р. *Haematococcus*), так и смеси данного пигмента с β-каротином (рр. *Bracteacoccus* и *Coelastrella*) [4]. Однако представители вида *Halochlorella rubescens* P.J.L. Dangard ранее не были обнаружены в данном регионе.

Важным элементом биотехнологии получения пигментов из микроводорослей является индукция в клетках вторичного каротиногенеза. У оксигенных фототрофных микроорганизмов для этого традиционно применяют культивирование под действием стрессовых факторов, таких как высокая интенсивность света, недостаток элементов минерального питания, изменение температуры или pH среды, как по отдельности, так и в различных сочетаниях [3].

Целью данной работы является характеристика нового арктического штамма микроводоросли NAMSU SBB-20 и оценка параметров накопления им каротиноидов в условиях дефицита минерального питания (по азоту и по фосфору) и воздействия света высокой интенсивности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение культуры нового штамма микроводоросли NAMSU SBB-20 из природы

Штамм микроводоросли NAMSU SBB-20 получен в 2020 г. из альго-бактериальной биопленки, содержащейся в водно-грунтовой пробе, отобранной на Большом Соловецком острове в бухте Благополучия (65°1'24" с.ш. 35°42'21" в.д.). Отбор пробы проводили из зоны средней литорали во время отлива, рядом с трубой, осуществляющей слив сточных вод из поселка Соловецкий (рис. 2а, б). Выделение штамма осуществляли на среде BG-11 [5], согласно ранее описанной методике [4]. Получение аксеничной культуры проводили по методикам, описанным в работе [6]. Штамм был депонирован в коллекцию NAMSU МГУ имени М.В. Ломоносова.

Таксономическая идентификация штамма NAMSU SBB-20

Таксономическую принадлежность микроводоросли штамма SBB-20 определяли с помощью мультилокусного анализа фрагментов генов рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (*rbcL*), гена 18S рРНК (*18S rRNA*) и ядерного рибосомального кластера генов, включающего внутренние транскрибируемые спейсеры (internal transcribed spacer, ITS) 1 и 2, а также ген 5.8S рРНК (фрагмент ITS1-5.8S рРНК-ITS2). Для выделения геномной ДНК осадок клеток микроводоросли замораживали в жидком азоте в пробирке объемом 1.5 мл (Eppendorf, Германия) с последующей гомогенизацией с помощью пестика для данных пробирок. Выделение ДНК из полученного гомогената проводили с помощью набора DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN, Германия) по протоколу производителя. Последовательности праймеров и протоколы ПЦР были использованы из ранее опубликованных работ [7–9]. Постановку ПЦР, очистку ПЦР-продуктов и их секвенирование проводили в соответствии с процедурой, описанной ранее [8].

Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных NCBI GenBank при помощи алгоритма парных локальных выравниваний BLAST [10]. Множественное выравнивание проводили при помощи алгоритма Muscle [11]. Все позиции в нуклеотидной последовательности, содержащие пропуски, не учитывались. Филогенетические деревья строили в программе MEGA X [12] с использованием алгоритма максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) [13] и K2+G по модели (2-параметрическая модель Кимуры с допущением о том, что частоты нуклеотидных замен подчиняются распределению Пуассона с параметром формы 5) [14]. Построение исходного дерева проводили с помощью алгоритма “ближайших соседей” (Neighbor-Joining), затем методом обрезки-прививки [15] проводили эвристический поиск. Достоверность топологии деревьев проверяли при помощи метода bootstrap [16] с 1000 повторностей.

Светлопольная микроскопия

Морфологический анализ культуры микроводоросли проводили при помощи световой микроскопии в светлопольном режиме на микроскопе Leica DM2500 (LEICA Microsystems, Германия), снабженном фотокамерой DFC 7000T того же производителя.

Просвечивающая электронная микроскопия

Ультраструктуру клеток изучали методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Фиксация и обезвоживание клеток были выпол-

Таблица 1. Условия культивирования, применимые в работе для оценки накопления в клетках микроводоросли вторичных каротиноидов

Обозначение	Среда культивирования	Интенсивность освещения, мкмоль квантов ФАР/м ² /с
LL	BG-11*	50
LL,-P	BG-11 без источника фосфора**	50
LL,-N	BG-11 ₀ без источника азота***	50
HL	BG-11	150
HL,-P	BG-11 без источника фосфора	150
HL,-N	BG-11 ₀ без источника азота	150

Примечание: * NaNO₃ (1.5 г/л), K₂HPO₄ (0.04 г/л), MgSO₄·7H₂O (0.075 г/л), CaCl₂·2H₂O (0.036 г/л), лимонная кислота (6 мг/л), цитрат аммонийного железа (6 мг/л), этилендиаминтетраацетат натрия двузамещенный (1 мг/л), Na₂CO₃ (20 мг/л), H₃BO₃ (2.86 мг/л), MnSO₄ (1.37 мг/л), ZnSO₄·7H₂O (0.222 мг/л), (NH₄)₂MoO₄ (0.032 мг/л), CuSO₄·5H₂O (0.079 мг/л), Co(NO₃)₂·6H₂O (0.0494 мг/л), dH₂O (1 л), pH 7.5.

** среда, не содержащая K₂HPO₄.

*** среда, не содержащая NaNO₃.

нены согласно протоколу, описанному в статье Gorelova с соавт. [17]. Сначала клетки были зафиксированы в 2% (масса : объем) растворе глutarового альдегида, приготовленного на 0.1 М буфере какодилата натрия (pH 7.4), при комнатной температуре в течение получаса. Далее была проведена пост-фиксация клеток в 1% (по массе) растворе тетраоксида осмия, приготовленного на том же буфере, в течение 4 ч. Образцы были заключены в эпоксидную смесь Araldite (Sigma-Aldrich, США). Приготовление полутонких срезов проводили на ультратоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия). Срезы были смонтированы на медные сеточки для электронной микроскопии с ультратонкой подложкой из формвара (Ted Pella, США). Для изучения ультраструктуры методом ПЭМ срезы дополнительно были контрастированы раствором цитрата свинца [18]. Изображения были получены на электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония).

Сканирующая электронная микроскопия

Клеточную поверхность микроводоросли изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого зафиксированные и обезвоженные образцы клеток переносили в ацетон и высушивали в критической точке CO₂ [19] в сушильной установке HSP-2 (Hitachi, Япония). Затем поверхность образцов напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке IB Ion Coater (Eiko, Япония) и исследовали в микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония) при инструментальном увеличении 60-20000х и ускоряющем напряжении 15 кВ [17], в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

Оценка влияния факторов стресса на пигментный состав

Для оценки влияния состава среды и интенсивности освещения на пигментный состав биомассы культуры проводили культивирование микроводоросли штамма SBB-20 в шести вариантах комбинации факторов (табл. 1). Были использованы как стандартная среда BG-11, так и ее модификации: безазотная среда BG-11₀ [20] и среда BG_{-P}, не содержащая источника фосфора, а также освещение низкой (50 мкмоль квантов ФАР/м²/с) и высокой (150 мкмоль квантов ФАР/м²/с) интенсивности. Инкубирование клеток микроводорослей в указанных условиях (табл. 1) проводили в пластиковых чашках Петри диаметром 10 см, в которые помещали по 10 мл периодической культуры штамма SBB-20 на 18 суток роста. Предварительное культивирование микроводоросли проводили в колбе объемом 750 мл, содержащей 300 мл среды BG-11, при перемешивании 85 об./мин в шейкере-инкубаторе New Brunswick Innova 44 (Eppendorf, Германия) и освещении 40 мкмоль фотонов/(м² с) ФАР.

Анализ содержания пигментов во всех пробах проводили в экстрактах, полученных путем инкубирования клеток с диметилсульфоксидом (ДМСО). Для этого отбирали аликвоты культуры объемом 1.5 мл. Далее центрифугировали в течение трех минут на скорости 14200 об./мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, Германия), удаляли супернатант и добавляли к осадку 1.5 мл ДМСО. Затем проводили инкубирование суспензии при 70°C в течение 5 мин при перемешивании на орбитальном термощейкере (800 об./мин), после центрифугирования (3 мин при максимальной скорости вращения) удаляли осадок. Далее к раствору добавляли еще 1.5 мл ДМСО и повторяли

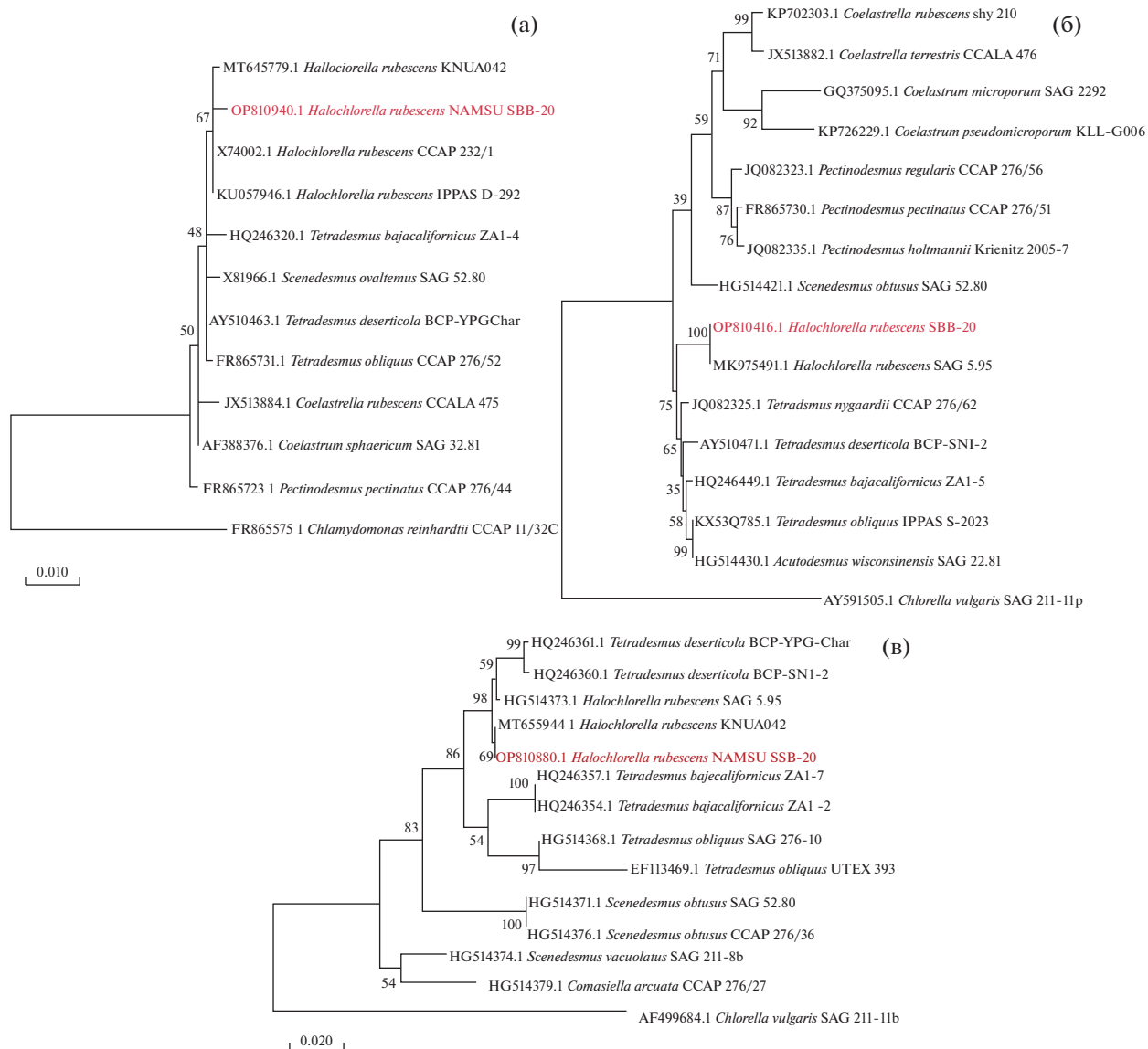


Рис. 1. Филогенетические деревья исследуемого штамма микроводоросли по локусам: *18SpPHK* (а), *ITS1-5.8S pPHK-ITS2* (б) и *rbcL* (в), полученные с помощью алгоритма максимального правдоподобия (Maximum likelihood). Полу жирным шрифтом выделен исследуемый штамм. Натуральный логарифм функции правдоподобия дерева с наиболее оптимальной топологией составил: -1368.91 (а); -2582.99 (б); -1907.41 (в). Длина анализируемых последовательностей: 749 (а); 512 (б); 620 (в) нуклеотидов. Перед названием таксона указан идентификатор в базе данных NCBI GenBank. Числа около узлов показывают, в каком проценте повторностей присутствовал данный элемент топологии при bootstrap-проверке. Шкала масштаба отражает количество замен, деленное на общее число позиций в выравнивании.

инкубирование при тех же условиях. Концентрации хлорофиллов *a* и *b*, а также суммарную концентрацию каротиноидов в полученных экстрактах определяли спектрофотометрически в стандартных кварцевых кюветках с длиной оптического пути, равной 1 см. Спектры поглощения в видимой и ближней ИК-области ($\lambda = 450\text{--}800$ нм) регистрировали на спектрофотометре Agilent Cary 300 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Расчеты концентраций хлорофиллов *a* и *b* и суммарной концентрации каротиноидов в полученных экстрактах проводили по уравнениям из работы [21].

Построение графиков, расчет значений стандартных отклонений проводили в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Таксономическая идентификация штамма микроводоросли

Филогенетический анализ полученного штамма микроводоросли проводили по трем локусам: *18SpPHK* (рис. 1а), *ITS1-5.8S pPHK-ITS2* (рис. 1б) и *rbcL* (рис. 1в). Полученные последовательности ис-

следуемого штамма по всем локусам кластеризовались с последовательностями, ассоциированными с видом *Halochlorella rubescens* (штаммы SAG 5.95, KNUA042, CCAP 232/1), что позволило отнести исследуемый штамм к данному виду. Полученные последовательности ДНК были депонированы в базу данных NCBI GenBank с присвоением идентификаторов OP810940.1 (*18SpPHK*), OP810416.1 (ITS1-5.8S *pPHK*-ITS2), OP819880 (*rbcL*).

*Характеристика стадий жизненного цикла
штамма и особенностей клеточной организации
H. rubescens NAMSU SBB-20*

В условиях, благоприятных для вегетативного роста (среда BG-11, интенсивность света 40 мкмоль ФАР/м²/с), суспензия клеток микроводоросли имела зеленый цвет. Культура была представлена, в основном, одиночными сферическими одноядерными клетками диаметром 5–8 мкм (рис. 2в). Наряду с одиночными клетками встречались скопления клеток, не объединенных общей поверхностной структурой, и немногочисленные митотически делящиеся одиночные клетки (рис. 2в, г). Отмечено формирование автоспорангиев с 4–8 автоспорами. Подвижные клетки – зооспоры – не обнаружены.

Поверхность одиночных клеток микроводоросли при исследовании методом СЭМ характеризовалась наличием четких борозд, которые сходятся в единую точку на полюсах клетки (рис. 2г). Вскрытие спорангиев и выход автоспор происходит за счет растворения части материнской оболочки спорангия.

Клетки *H. rubescens*, культивируемые на свету низкой интенсивности, на ультратонких срезах имели сравнительно развитый фотосинтетический аппарат, представленный пристенным хлоропластом, в котором выявлялись крахмальные зерна и, как правило, пиреноид, разделенный пиреноидальными тилакоидами на 2–4 скорлупки. В цитоплазме клеток присутствовало одно ядро, многочисленные митохондрии и вакуоли с различными включениями (рис. 2д, е).

*Характеристика культуры при росте
в неблагоприятных условиях*

Клетки культуры штамма *H. rubescens*, выращиваемые в условиях высокой интенсивности света (НЛ, см. табл. 1), имели оранжевый оттенок (рис. 3а). Спектр экстракта пигментов, выделенных с помощью ДМСО из биомассы микроводоросли, культивируемой на свету высокой интенсивности и стандартной среде BG-11, представлен на рис. 3б; в качестве контроля приведен спектр пигментов из культуры, выращиваемой на среде BG-11 при освещении низкой интенсивности. Данный спектр показывает увеличение значений оптической плотности в сине-зеленой области

спектра для клеток, культивируемых в условиях повышенной интенсивности света, по сравнению со спектрами контрольной пробы. Максимумы на спектре экстрактов пигментов располагались в области поглощения каротиноидов и приблизительно соответствовали максимумам поглощения β-каротина (466 нм) и астаксантина (492 нм).

Анализ ультратонких срезов клеток, выращенных в условиях высокой интенсивности света (НЛ, см. табл. 1), показал существенные перестройки. Практически всю площадь среза клеток занимают липидные включения (олеосомы) пониженной электронной плотности (рис. 3в). Редко выявлялись крахмальные зерна и пластоглобулы, различимые на срезе как округлые включения более высокой электронной плотности, расположенные в клетке, по-видимому, в области деградировавшего фотосинтетического аппарата (рис. 3г). Интактные хлоропласты отсутствовали.

На 14 сутки культивирования *H. rubescens* в чашках Петри в условиях высокой интенсивности света и недостатка элементов минерального питания, азота (НЛ, -N, табл. 1) или фосфора (НЛ, -P, табл. 1), отмечено наибольшее значимое изменение цвета культуры среди шести вариантов условий культивирования (табл. 1) (рис. 4а–е). При продолжении выращивания микроводоросли в тех же чашках Петри при шести комбинациях факторов состава среды и интенсивности света, биомасса клеток всех вариантов культивирования, кроме контроля (LL), характеризовалась приобретением оранжевого цвета разной степени интенсивности (рис. 4ж–м). Оценка количественных параметров накопления каротиноидов, выделенных из биомассы клеток после 21 суток культивирования на свету высокой интенсивности и дефицита азота и фосфора представлена на рис. 5. Показано увеличение абсолютного (Кар, мг/л) и относительного (Кар/Хл, мг/мг) содержания каротиноидов при культивировании на свету высокой интенсивности. При этом максимальные значения 15.66 ± 0.18 и 15.95 ± 0.56 были отмечены для образцов, находящихся в условиях дефицита фосфора (НЛ, -P) и азота (НЛ, -N), соответственно. Относительное содержание каротиноидов, нормированных на концентрацию общего хлорофилла ($C_{\text{хл}a} + C_{\text{хл}b}$), имело наибольшие значения 0.98 ± 0.03 на полной среде (НЛ) и 1.00 ± 0.00 на среде, модифицированной по содержанию фосфора (НЛ, -P).

ОБСУЖДЕНИЕ

Описанный штамм согласно филогенетическому анализу имеет наибольшую гомологию с видом *Halochlorella rubescens* P.J.L.Dangeard (штамм SAG 5.95) (рис. 1). Данный вид также описан как *Scenedemus rubescens* (P.J.L.Dangeard) E.Kessler, M.Schafer, C.Hummer, A.Kloboucek & V.A.R.Huss,

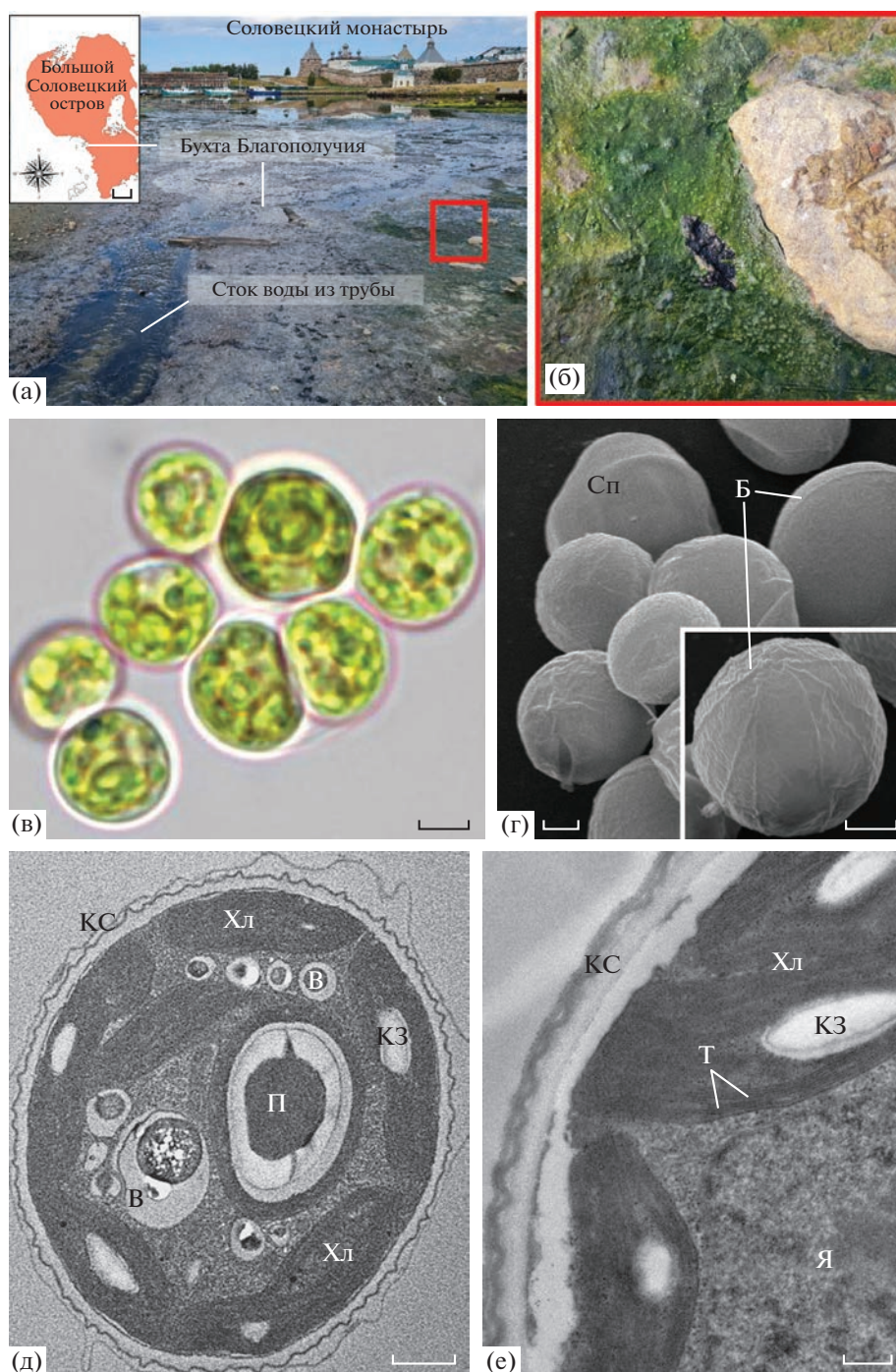


Рис. 2. Характеристика штамма *H. rubescens* NAMSU SBB-20: а, б — место выделения штамма и внешний вид альго-бактериальной биопленки, из которой был выделен штамм; в — морфологические особенности вегетативных “зеленых” клеток; г — поверхность одиночных вегетативных клеток и спорангиев, исследованная с помощью СЭМ; д, е — ультраструктурные особенности вегетативных клеток. Масштабные отрезки: 3 мкм (а); 2 мкм (в, г); 1 мкм (д); 200 нм (е). Обозначения: Б — борозда, В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, КС — клеточная стенка, П — пиреноид, Сп — спорангий с автоспорами, Т — тилакоиды хлоропласта, Хл — хлоропласт, Я — ядро.

однако, согласно современной точке зрения и онлайн базе данных AlgaeBase [22], *S. rubescens* признан синонимом *H. rubescens*. Виды рода *Scenedesmus* являются в основном пресноводными представителями, в то время как, штамм, описанный

как *Halochlorella rubescens* CCAC 0126, был выделен, как и штамм SBB-20 с морского побережья, из зоны супралиторали (www.ccac.uni-koeln.de).

По-видимому, наиболее ранним описанным штаммом данного вида является *Scenedesmus*

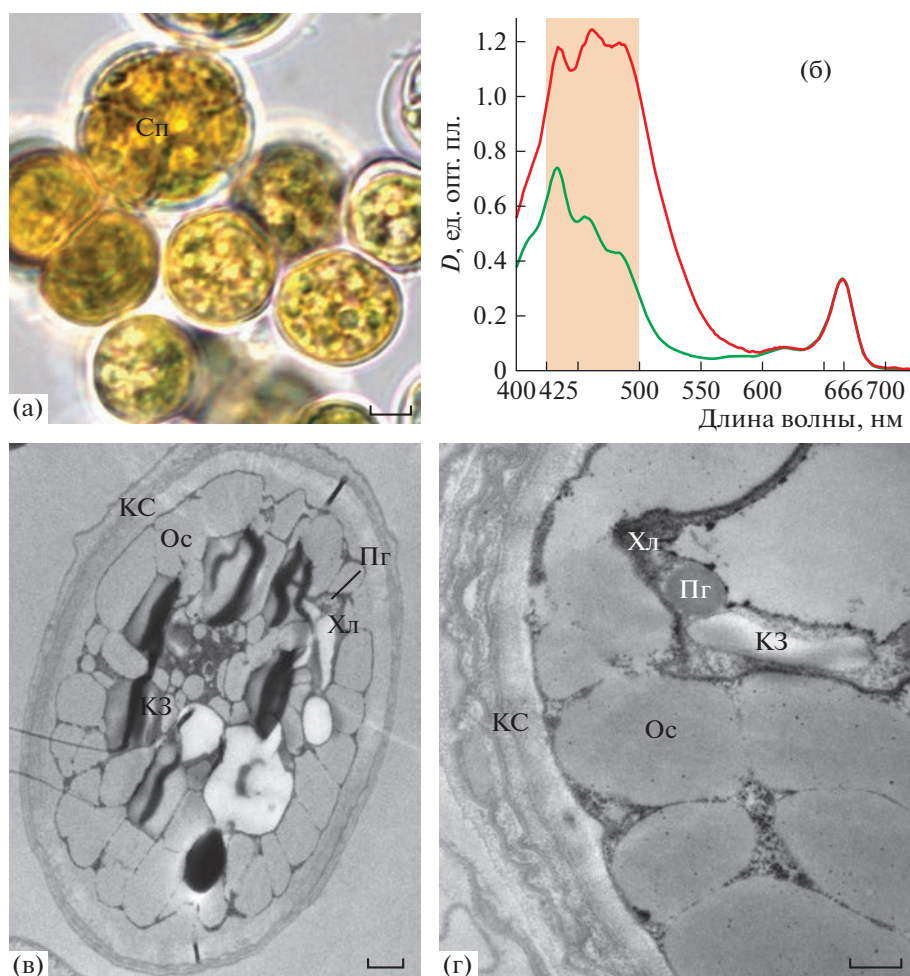


Рис. 3. Характеристика клеток штамма *H. rubescens* NAMSU SBB-20 после индукции каротиногенеза: а – морфологические особенности “оранжевых” клеток; б – спектр поглощения экстрактов пигментов в ДМСО “зеленых” (спектр зеленого цвета) и “оранжевых” (спектр красного цвета) клеток, нормированных по поглощению при $\lambda = 666$ нм; ультраструктурные особенности “оранжевых” клетки (в) и фрагмента автоспоры в автоспорангии (г). Обозначения: КЗ – крахмальное зерно, КС – клеточная стенка, Пг – пластоглобулы, Ос – олеосомы, Хл – хлоропласт.

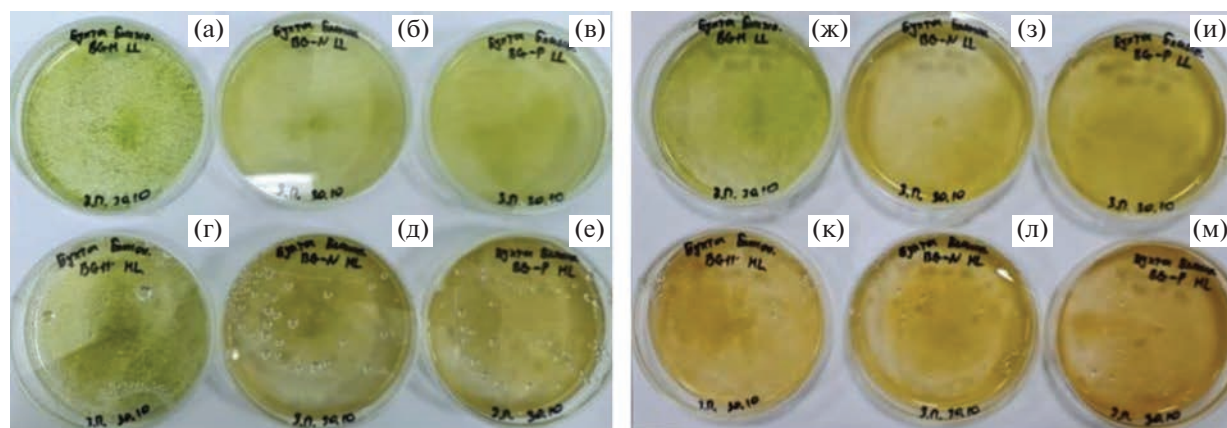


Рис. 4. Внешний вид чашек Петри, содержащих биомассу культуры микроводоросли штамма *H. rubescens* NAMSU SBB-20 после 14 (а–е) и 21 (ж–м) суток культивирования в стрессовых условиях: а, ж – неяркий свет (50 мкмоль квантов ФАР/м²/с), полная среда BG-11 (LL); б, з – неяркий свет, среда BG-11 без источника N (LL,-N); в, и – неяркий свет, среда BG-11 без источника P (LL,-P); г, к – яркий свет (150 мкмоль квантов ФАР/м²/с), полная среда BG-11 (HL); д, л – яркий свет, среда BG-11 без источника N (HL,-N); е, м – яркий свет, среда BG-11 без источника P (HL,-P).

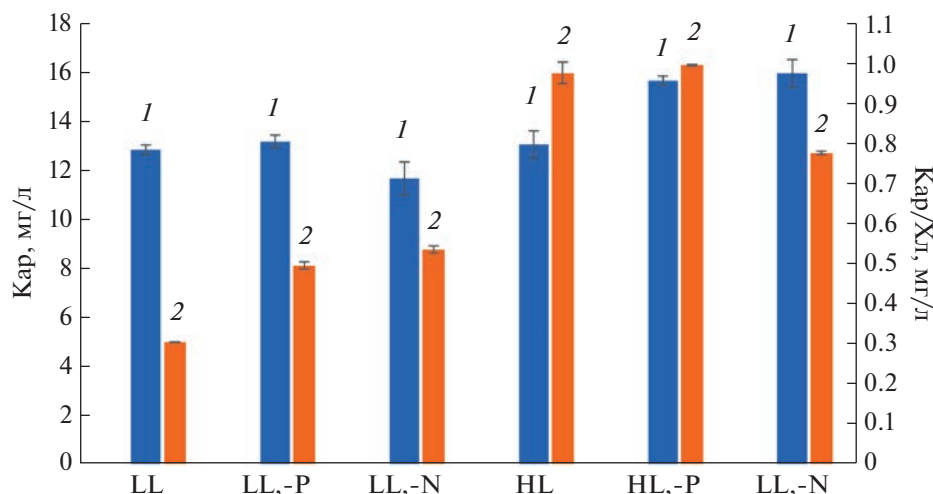


Рис. 5. Параметры накопления каротиноидов клетками штамма *H. rubescens* SBB-20 при различных условиях культивирования. 1 — абсолютные значения (Кар, мг/л); 2 — относительные значения (Кар/Хл, мг/мг). LL — культивирование на свету низкой интенсивности (50 мкмоль квантов ФАР/м²/с); LL,-N — неяркий свет, среда BG-11 без источника N; LL,-P — неяркий свет, среда BG-11 без источника P; HL — культивирование на свету высокой интенсивности (150 мкмоль квантов ФАР/м²/с); HL,-N — яркий свет, среда BG-11 без источника N; HL,-P — яркий свет, среда BG-11 без источника P. Указаны стандартные отклонения, рассчитанные по двум повторностям.

rubescens CCAP 232/1, который первоначально (до проведения филогенетического анализа [23]) относился к виду *Chlorella fusca* var. *rubescens* [24]. Данный таксон также является синонимом *H. rubescens* согласно онлайн базе данных AlgaeBase. Штамм *S. rubescens* CCAP 232/1, как и исследованный в настоящей работе штамм *H. rubescens* SBB-20, имеет сеть тонких ребер и полярных утолщений на поверхности клетки [25], является одноклеточной водорослью с пиреноидом в хлоропласте и характеризуется способностью к накоплению вторичных каротиноидов [26]. Помимо филогенетического анализа (рис. 1), сходство в экологической приуроченности и морфологических и физиологических признаках подтверждают принадлежность исследуемого штамма SBB-20 к виду *Halochlorella rubescens*. Согласно доступным информационным источникам, данный вид был обнаружен в биоте Белого моря впервые [27].

Штаммы вида *H. rubescens* (*S. rubescens*) являются объектом ряда исследований, в которых рассматривалась возможность его применение для биоизъятия азота и фосфора из сточных вод [28], продукции биотоплива [29, 30], в качестве источника смеси вторичных каротиноидов [29].

Согласно анализу пигментного состава экстрактов биомассы *H. rubescens* NAMSU SBB-20, наибольшие показатели накопления каротиноидов отмечены для условий культивирования при высокой интенсивности света и в отсутствии источника азота (HL,-N, табл. 1) или фосфора (HL,-P, табл. 1) (рис. 5). В связи с тем, что штамм *H. rubescens* NAMSU SBB-20 был выделен из точки, расположенной в непосредственной близости от стока

бытовых отходов (см. раздел Материалы и методы), для которых показано повышенное содержание фосфора и азота [28], недостаток данных элементов в среде культивирования может являться стрессовым фактором и индуцировать вторичный каротиногенез. Количественные данные по накоплению каротиноидов в биомассе штамма SBB-20 в условиях стресса соответствуют данным литературы по накоплению пигментов пресноводным штаммом *Scenedesmus (Halochlorella) rubescens* KNUA042 [29]. Наибольшее относительное количество каротиноидов в условиях стресса в данной работе превышало таковые значения для штамма SBB-20 (1.50 ± 0.01 против 1.00 ± 0.00 для штаммов KNUA042 и SBB-20, соответственно). Однако абсолютные значения концентрации каротиноидов в экстрактах, полученных из биомассы клеток штамма *H. rubescens* NAMSU SBB-20, культивируемых в неблагоприятных условиях, были выше, чем содержание тех же пигментов в экстрактах клеток штамма KNUA042 после индукции каротиногенеза (15.95 ± 0.56 мг/л против 6.94 ± 0.06 мг/л для штаммов SBB-20 и KNUA042, соответственно).

Ультраструктурные изменения в клетках микроводоросли *H. rubescens* при культивировании на свету высокой интенсивности, типичны для клеток зеленых каротиногенных микроводорослей [31]. В условиях стресса происходит разборка фотосинтетического аппарата клетки, необходимая для защиты от избыточного света, и накопление образующихся при этом триацилглицеринов в олеосомах цитоплазмы [32, 33], занимающих практически весь объем клетки [31]. Описанные изменения ультраструктурной организации характерны и для кле-

ток *H. rubescens* NAMSU SBB-20. Известно, что в цитоплазматических глобулах у каротиногенных микроводорослей может происходить накопление астаксантина [34], при этом β -каротин преимущественно накапливается в пластоглобулах [33]. Формирование в клетках *H. rubescens* NAMSU SBB-20, культивируемых в условиях стресса, липидных включений обоих типов (рис. 3в, г), а также характерные пики двух данных каротиноидов на спектрах экстрактов пигментов клеток (рис. 3б), позволяют предположить накопление данной микроводорослью смеси каротиноидов, среди которых присутствуют астаксантин и β -каротин, что встречается у штаммов родственных видов [31, 35], а также других штаммов *H. rubescens* [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе охарактеризован новый перспективный для биотехнологии штамм микроводоросли *H. rubescens* NAMSU SBB-20, описаны ультраструктурные изменения под действием стресса, вызванного светом высокой интенсивности, а также изменение пигментного состава (увеличение содержания каротиноидов). В связи с тем, что данный штамм был выделен из морской среды обитания, он, по-видимому, обладает устойчивостью к повышенной солености и может быть использован для культивирования на морской воде, что требует дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность профессору кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, д.б.н. А.Е. Соловченко за помощь в интерпретации некоторых результатов. Электронно-микроскопические исследования были проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (№ МК-1952.2021.1.4), а также Научно-образовательной школы МГУ “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология”.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borowitzka M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters // J. Biotechnol. 1999. V. 70. № 1-3. P. 313. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
2. Guerin M., Huntley M., Olaiyola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition // Trends Biotechnol. 2003. V. 21. № 5. P. 210. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)
3. Solovchenko A., Chekanov K. Production of carotenoids using microalgae cultivated in photobioreactors // Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology / Eds. Paek K.Y., Murthy H., Zhong J. Dordrecht: Springer. 2014. P. 63. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_4
4. Chekanov K., Fedorenko T., Kublanovskaya A., Litvinov D., Lobakova E. Diversity of carotenogenic microalgae in the White Sea polar region // FEMS Microbiol. Ecol. 2020. V. 96. P. 183. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz183/5632105>
5. Stanier R., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // Bacteriol. Rev. 1971. V. 35. P. 171. <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>
6. Темралева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). Кострома: Костромской печатный дом, 2014. 215 с.
7. Wang Y., Tian R.M., Gao Z.M., Bougouffa S., Qian P.Y. Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis // PloS one. 2014. V. 9. № 3. e90053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090053>
8. Ismagulova T., Chekanov K., Gorelova O., Baulina O., Semenova L., Selyakh, I., Chivkunova O., Lobakova E., Karpova O., Solovchenko A. A new subarctic strain of *Tetradismus obliquus* — part I: identification and fatty acid profiling // J. Appl. Phycol. 2018. V. 30. № 5. P. 2737. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1313-1>
9. Maltsev Y., Gusev E., Maltseva I., Kulikovskiy M., Namsaraev Z., Petrushkina M., Filimonova A., Sorokin B., Golubeva A., Butaeva G., Khrushchev A., Zotko N., Kuzmin D. Description of a new species of soil algae, *Parietochloris grandis* sp. nov., and study of its fatty acid profiles under different culturing conditions // Algal Res. 2018. V. 33. P. 358. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.008>
10. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3389. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
11. Edgar G.J., Stuart-Smith R.D., Willis T.J., Kininmonth S., Baker S.C., Banks S., Thomson R.J. Global conservation outcomes depend on marine protected areas with five key features // Nature. 2014. V. 506. № 7487. P. 216.
12. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
13. Aldrich J. RA Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922 // Stat Sci. 1997. V. 12. № 3. P. 162. <https://doi.org/10.1214/ss/1030037906>
14. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. № 2. P. 111. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

15. *Nei M., Kumar S.* Molecular evolution and phylogenetics. Oxford: Oxford University Press, 2000. 348 p.
16. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. V. 39. № 4. P. 783.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
17. *Gorelova O., Baulina O., Solovchenko A., Selyakh I., Chivkunova O., Semenova L., Scherbakov P., Burakova O., Lobakova E.* Coordinated rearrangements of assimilatory and storage cell compartments in a nitrogen-starving symbiotic chlorophyte cultivated under high light // *Arch. Microbiol.* 2015. V. 197. P. 181.
<https://doi.org/10.1007/s00203-014-1036-5>
18. *Reynolds E.* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. № 1. P. 208.
<https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
19. *Anderson T.F.* Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope // *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 1951. V. 13. № 4. P. 130.
<https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1951.tb01007.x>
20. *Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // *Microbiology*. 1979. V. 111. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
21. *Solovchenko A., Merzlyak M.N., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S.* Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *parietochloris incisa* (Chlorophyta, trebouxiophyceae) mutant deficient in $\delta 5$ desaturase by nitrogen starvation and high light // *J. Phycol.* 2010. V. 46. № 4. P. 763.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00849.x>
22. *Guiry M.D., Guiry G.M.* AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway; <https://www.algaebase.org/>; searched on 26 November 2022
23. *Kessler E., Schäfer M., Hümmer C., Kloboucek A., Huss V.A.R.* Physiological, biochemical, and molecular characters for taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta) // *Bot. Acta*. 1997. V. 110. P. 244.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1997.tb00636.x>
24. *Kessler E., Czygan F.C., Fott B., Nováková M.* Über *Halochlorella rubescens* Dangeard // *Protistenk.* 1968. V. 110 P. 462.
25. *Kalina T., Puncová M.* Taxonomy of the subfamily Scotielloecystoideae Fott 1976 (Chlorellaceae, Chlorophyceae) // *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographische Beiträge*. 1987. V. 73. № 4. P. 473.
26. *Huss V.A., Frank C., Hartmann E.C., Hirmer M., Kloboucek A., Seidel B.M., Wenzeler P., Kessler E.* Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta) // *J. Phycol.* 1999. V. 35. № 3. P. 587.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x>
27. *Чесунов А.В., Калякина Н.М., Бубнова Е.Н.* Каталог биоты Беломорской биологической станции МГУ. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2008. 384 с.
28. *Shi J., Podola B., Melkonian M.* Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae // *Biores. Technol.* 2014. V. 154. P. 260.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.100>
29. *Jo S.W., Hong J.W., Do J.M., Na H., Kim J.J., Park S.I., Kim Y.S., Kim I.S., Yoon H.S.* Nitrogen deficiency-dependent abiotic stress enhances carotenoid production in indigenous green microalga *Scenedesmus rubescens* KNUA042, for use as a potential resource of high value products // *Sustainability*. 2020. V. 12. № 13. P. 5445.
<https://doi.org/10.3390/su12135445>
30. *Tsavatopoulou V.D., Aravantinou A.F., Vakros J., Manariotis I.D.* Conversion of *Scenedesmus rubescens* lipid into biodiesel by biochar of different origin // *Catalysts*. 2021. V. 11. № 9. P. 1116.
<https://doi.org/10.3390/catal11091116>
31. *Zaytseva A., Chekanov K., Zaytsev P., Bakhareva D., Gorelova O., Kochkin D., Lobakova E.* Sunscreen effect exerted by secondary carotenoids and mycosporine-like amino acids in the aeroterrestrial chlorophyte *Coelastrella rubescens* under high light and UV-A irradiation // *Plants*. 2021. V. 10. № 12. P. 2601.
<https://doi.org/10.3390/plants10122601>
32. *Solovchenko A.E.* Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. № 2. P. 167.
<https://doi.org/10.1134/S1021443712020161>
33. *Davidi L., Shimoni E., Khozin-Goldberg I., Zamir A., Pick U.* Origin of β -carotene-rich plastoglobuli in *Dunaliella bardawil* // *Plant Physiol.* 2014. V. 164. № 4. P. 2139.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.235119>
34. *Ota S., Morita A., Ohnuki S., Hirata A., Sekida S., Okuda K., Ohya Y., Kawano S.* Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23854-w>
35. *Chekanov K., Litvinov D., Fedorenko T., Chivkunova O., Lobakova E.* Combined production of astaxanthin and β -carotene in a new strain of the microalga *Bracteacoccus aggregatus* BM5/15 (IPPAS C-2045) cultivated in photobioreactor // *Biology*. 2021. V. 10. № 7. P. 643.
<https://doi.org/10.3390/biology10070643>

УДК 581.1

РОЛЬ КИНАЗЫ SNRK1 В ОТВЕТЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА НА СОЛЕВОЙ СТРЕСС

© 2023 г. А. В. Муртузова^а, Е. В. Тютерева^{а, *}, О. В. Войцеховская^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки “Ботанический институт имени В.Л. Комарова Российской академии наук”, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ETutereva@binran.ru

Поступила в редакцию 21.12.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Киназа SnRK1 (Sucrose non-fermenting-Related protein Kinase 1) растений регулирует активацию катаболических процессов, включая автофагию, в ходе стрессовых ответов. SnRK1 часто рассматривают как сенсор энергетического статуса клетки. Фотосинтез является крупнейшим процессом, поставляющим энергию зеленым клеткам растений на свету, и можно полагать, что SnRK1 является одним из его регуляторов. В листьях линий *Arabidopsis*, различающихся уровнем экспрессии гена *KIN10*, кодирующего каталитическую субъединицу SnRK1, сравнивали квантовый выход фотосистем и нефотохимического тушения флуоресценции, формирование электрохимического градиента протонов на тилакоидных мембранах, а также содержание АТФ в проростках в оптимальных условиях и при воздействии солевого стресса. В результате проведенного исследования нами показаны изменения фотохимической активности хлоропластов, ассоциированные с конститутивной активацией SnRK1 киназы в двух линиях, сверхэкспрессирующих каталитическую субъединицу KIN10. Обнаруженные особенности световых реакций фотосинтеза сохранялись в этих линиях и при благоприятных условиях роста, и при адаптации к солевому стрессу. Подавление функции SnRK1 киназы методом замалчивания РНК-интерференцией в линиях арабидопсиса, напротив, приводило к отсутствию выраженного ответа на солевой стресс на уровне фотохимической активности хлоропластов.

Ключевые слова: катаболизм, фотосинтез, засоление, SnRK1, *Arabidopsis thaliana*

DOI: 10.31857/S0015330322600796, **EDN:** IBVUFZ

ВВЕДЕНИЕ

У растений одним из крупных регуляторов роста и морфогенеза выступает киназный комплекс TOR (target of rapamycin) [1]. TOR является основным активатором анаболических процессов в клетках эукариот. В условиях стресса рост растений останавливается и происходит активация катаболических программ, в том числе автофагии, что предоставляет необходимые энергетические эквиваленты и метаболиты как для биосинтеза защитных веществ и ферментов, так и для замены поврежденных компонентов клетки новыми. В некоторых случаях стрессовое воздействие приводит к запуску запрограммированной клеточной смерти (ПКС), или мега-автолиза, что также можно рассматривать как крайнюю степень катаболизма. Катаболизм и защитные программы у растений находятся под контролем другого киназного комплекса — SnRK1 [2]. SnRK1 представляет собой растительный ортолог АМР-киназы (АМРК) животных, и Sucrose Non-Fermenting 1 (SNF1)-киназы дрожжей. В клетках

эукариот киназы АМРК, SNF1 и SnRK1 считаются сенсорами их энергетического статуса; они активируются в стрессовых условиях и выступают ингибиторами киназного комплекса TOR [3]. В условиях недостатка энергии SnRK1 помогает восстановить энергетический баланс, усиливая, с одной стороны, гликолиз, митохондриальное дыхание и окисление жирных кислот, а с другой стороны — ингибируя биосинтетические пути, в которых расходуется АТФ [4]. Это может достигаться либо прямым фосфорилированием ключевых ферментов различных метаболических путей, например, гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы или сахарозофосфатсинтазы, либо транскрипционной регуляцией, например, генов, участвующих в автофагии (autophagy-related genes, *ATG*) [2, 4, 5]. Таким образом, регуляторный модуль “TOR-SnRK1” у сельскохозяйственно ценных культур представляет собой очень привлекательную мишень регуляции: тонкая настройка этого модуля у растения может помочь достичь одновременной активации программ роста и механизмов защиты от стрессов, не вызывая запуска таких программ

стрессового ответа как ПКС [3, 6]. Это позволило бы получать растения с высоким уровнем стрессоустойчивости и урожайности даже в субоптимальных условиях; однако, для достижения этой амбициозной цели необходимо точное понимание того, каким образом модуль “TOR-SnRK1” интегрирован в метаболизм растений.

В отличие от ортологичных киназ дрожжей и животных, у растений главными регуляторами TOR и SnRK1 выступают молекулы сахаров и сахарофосфатов. Киназный комплекс TOR растений активируется в присутствии глюкозы — единственного пока метаболита, для которого доказано прямое влияние на активность TOR у растений [1]. Активность киназы SnRK1 растений регулируется главным образом сахарофосфатами, что резко отличается от клеток дрожжей и животных, в которых основным аллостерическим регулятором ортологичных киназ SNF1 и AMPK выступает АМФ [3]. Столь важная роль сахаров и сахарофосфатов в регуляции баланса между анаболизмом и катаболизмом (опосредованно через киназные комплексы TOR и SnRK1), возможно, связана с тем, что именно сахара — продукты фотосинтеза — обеспечивают приток энергии в метаболизм растений. Для обеих киназ, TOR и SnRK1, было показано участие в регуляции фотосинтетического метаболизма. TOR играет важную роль в регуляции фотоморфогенеза, в том числе позеленения пластид [1]. У проростков *Arabidopsis* ингибирование TOR приводило к изменению экспрессии множества генов, участвующих в фотосинтезе [7]. В зрелых листьях растений *Arabidopsis* TOR участвует в регуляции плазмодесм, и, таким образом, экспорта фотосинтатов из листа и их распределения между донорными органами [8]. Влияние SnRK1 на фотосинтетический метаболизм растений в настоящий момент является предметом активного изучения [9]. Блокирование электронного транспорта в ФСII с помощью диурона вызывало активацию SnRK1 [2]. В то же время показано, что транскрипция многих генов, участвующих в фотосинтезе, зависит от активности SnRK1 [10], и ряд ядерных генов, кодирующих фотосинтетических белки, регулируется транскрипционными факторами — потенциальными мишенями фосфорилирования SnRK1 [5]. SnRK1 мигрирует между цитоплазмой и ядром в суточном цикле [11] и в ответ на стресс [12]; показано, что перенос SnRK1 из цитоплазмы в ядро коррелирует с уровнем фотосинтетической продукции АТФ [11]. В некоторых работах высказано предположение, что SnRK1 может быть локализована и в хлоропластах [13]. Также показано, что SnRK1 оптимизирует нитратный сигналинг в ответ на голодание по углероду или азоту [14]. В том случае, когда фотосинтез значительно снижен (например, по причине недостатка света, ингибирования переноса электронов в электрон-транс-

портной цепи) или развивается голодание по азоту, SnRK1 подавляет нитратный сигналинг путем фосфорилирования регуляторного белка NLP7, что приводит к блокированию его переноса из цитоплазмы в ядро и последующей деградации [14].

Поскольку активность SnRK1 зависит от энергетического статуса клетки, можно предположить, что эта киназа участвует, напрямую или опосредованно, в регуляции фотосинтетической продукции энергии в хлоропластах либо ее адаптации к потребностям клетки в энергии или сахарах. Однако до настоящего времени данный вопрос не исследовался.

Киназный комплекс SnRK1 включает три субъединицы, две регуляторные (β и $\beta\gamma$) и одну каталитическую α -субъединицу; каждая субъединица представлена несколькими изоформами. Комбинации различных изоформ, возможно, могут образовывать киназные комплексы с несколькими различными функциональными характеристиками [15, 16]. У *Arabidopsis* каталитическая α -субъединица кодируется тремя генами, *KIN10*, *KIN11* и *KIN12*, но экспрессируются, по-видимому, только два гена, *KIN10* и *KIN11* [2]. Сверхэкспрессия *KIN10* приводит к соответствующему увеличению ферментативной активности SnRK1 [2]. Активация SnRK1 может осуществляться либо при изменении концентраций ингибирующих метаболитов, т.е. сахаров и сахарофосфатов, либо фосфорилированием ее каталитической субъединицы с помощью киназ SnAK (SnRK1-Activating Kinases). Примечательно, что *in vivo*, по-видимому, активна только небольшая часть SnRK1, а большая часть белка активируется в условиях стресса [15]. Несмотря на это, растения со сверхэкспрессией *KIN10* (*KIN10-OX*) проявляли отчетливый фенотип при прорастании и на стадии проростка даже в оптимальных условиях [2, 17]. В условиях стрессов, таких как голодание по углероду, засуха, гипоксия или засоление, растения *KIN10-OX* оставались более жизнеспособными, чем растения дикого типа или растения, у которых экспрессия *KIN10* была подавлена по механизму РНК-интерференции (*KIN10-RNAi*) [17, 18]. Высокая стрессоустойчивость объяснялась увеличением индукции автофагии в растениях *KIN10-OX* из-за ингибирования комплекса TOR [17, 18]. Примечательно, что активация автофагии наблюдалась в растениях *KIN10-OX* по сравнению с растениями дикого типа даже в оптимальных условиях [17, 18].

Цель данной работы — анализ влияния сверхэкспрессии *KIN10*, кодирующего каталитическую α -субъединицу SnRK1-киназы, а также подавленной по механизму РНК-интерференции экспрессии *KIN10* на световые реакции фотосинтеза в листьях взрослых растений *Arabidopsis thali-*

ana, выращенных на почве в оптимальных условиях и под воздействием солевого стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения и условия выращивания. Семена *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. экотипа Landsberg erecta (Ler) были получены в Ноттингенском центре Арабидопсиса (Великобритания). Растения с измененным уровнем экспрессии гена AT3G01090 — две линии сверхэкспрессоров каталитической субъединицы киназы SnRK1, (O1 и O2 линии, далее по тексту — *KIN10-OX1* и *KIN10-OX2*), и две линии RNAi с нокадауном *KIN10*, (10-1 и 10-2 линии, далее по тексту — *KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2*), были любезно предоставлены Dr. Filip Rolland (Католический Университет г. Левен, Бельгия). После поверхностной стерилизации семена высаживали вертикально на чашки со средой Мурасиге-Скуга (MC1) с добавлением 1% (м/об) сахарозы и 0.35% (м/об) фитагеля (“Sigma-Aldrich”, США). В возрасте 14 дней проростки перенесли в почву (почва: торф = 1: 1). Проростки росли при 20–22°C и плотности потока фотонов 150 мкмоль/(м² с), относительной влажности 80% в режиме 16 ч свет/8 ч темнота. В опытах использовали как 12-дневные проростки, так и взрослые 6–7-недельные растения. Полив производился каждый второй день 10% раствором Хогланда [19]. Для создания солевого стресса экспериментальную группу растений в течение недели поливали через день 30 мл 10% раствора Хогланда с добавлением NaCl до конечной концентрации 100 мМ. Контрольную группу растений поливали тем же количеством 10% раствора Хогланда без добавления NaCl.

Определение уровня экспрессии генов интереса методом ПЦР в реальном времени. РНК экстрагировали из листьев *Arabidopsis* реагентом TRIzol [20]. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой, очищенной от РНКаз (“Thermo Scientific”, США). Синтез кДНК проводили с помощью набора реактивов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (“Thermo Scientific”, США). Эффективность обработки ДНКазой препарата тотальной РНК перед проведением обратной транскрипции, а также качество синтезированной кДНК проверяли с помощью классической ПЦР с праймерами к гену убиквитина (F: 5'-ATGCGATYTTTGTGAAGAC-3', R: 5'-AC-CACCACGRAGACGGAG-3'). ПЦР проводили с помощью C1000 Touch Thermal Cycler (“BioRad”, США). Программа ПЦР включала: 1) денатурацию матрицы ДНК при 95°C, 5 мин; 2) 34 цикла амплификации, состоящих из денатурации ДНК при 95°C, 30 с; отжига праймеров при 52°C, 30 с и элонгации при 72°C, 75 с; 3) завершение синтеза ДНК при 72°C, 5 мин. ПЦР-РВ проводили с помощью термоциклера Eco Real-Time PCR system

(“Illumina Eco”, США) и набора реактивов для ПЦР SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Программа включала: 1) активацию полимеразы при 95°C, 10 мин; 2) 40 циклов амплификации, состоящих из денатурации ДНК при 95°C, 15 с; отжига праймеров при 56°C, 30 с и элонгации при 72°C, 30 с; 3) построение кривых плавления: а) 95°C, 15 с; б) 55°C, 15 с; в) 95°C, 15 с. Для каждого гена были синтезированы три пары специфических праймеров (“Евроген”, Россия). Использовали только те праймеры, которые приводили к накоплению единственного ампликона согласно анализу кривых плавления и показывали эффективность ПЦР ≥ 95%. В качестве референсного гена использовали *A. thaliana* Actin2 (AT3G18780). Выбранные праймеры для *AtKIN10* были следующими: F: 5'-ACCACCTCATCGAATCGCTC-3', R: 5'-GGATGAGCCCGAGACTGAAG-3'; для *AtKIN11* — F: 5'-ATTCTCGGATCTACTCCAAGACG-3', R: 5'-ATCTCCCTCCTCACTTTCTCT-3'; для *AtAct2* — F: 5'-TCCTCTCCGCTTTGAATT-3', R: 5'-CCAGCCTTCACCATACCG-3'. На одну реакцию ПЦР-РВ использовали 10 нг матрицы кДНК. ПЦР-РВ для каждого генотипа проводили в четырех биологических и трех аналитических повторностях. Результаты обрабатывали с использованием уравнения 2^{-ΔCt} [21].

Измерения флуоресценции хлорофилла *a* осуществляли с помощью Dual-PAM 100 (“Walz”, Германия). Регистрацию световых кривых проводили на неотделенных листьях арабидопсиса. В режиме двухканальной записи для одновременного определения фотохимической активности фотосистем ФСІ и ФСІІ осуществляли следующую программу измерений: после 1 ч темновой адаптации определяли значения начальной флуоресценции F_0 , максимальной флуоресценции F_m (в темноте) и P700-зависимого сигнала модулированного отражения/поглощения света P_m (согласно встроенной программе после 5 с предосвещения дальним красным светом), а затем 11 этапов освещения с постепенным увеличением интенсивности актиничного красного света (0, 18, 25, 34, 65, 107, 138, 228, 351, 543 и 837 мкЕ м⁻² с⁻¹). Длительность каждого этапа освещения составляла 30 с, общая длительность записи световой кривой — 5 мин. В конце каждого этапа освещения подавался насыщающий импульс (5000 мкЕ м⁻² с⁻¹ в течение 800 мс) и детектировались следующие параметры: $Y(I)$ — реальный квантовый выход ФСІ, $Y(II)$ — реальный квантовый выход ФСІІ, $Y(NPQ)$ — квантовый выход регулируемой диссипации энергии, $Y(NO)$ — квантовый выход нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции. В экспериментах было изучено по 10 растений контрольной и экспериментальной групп для каждого генотипа.

Анализ электрохромного сдвига поглощения пигментов. Использовали систему Dual-PAM 100 (“Walz”, Германия) с дополнительным P515/535 модулем, включающим в себя эмиттер Dual-EP515 и детектор Dual-DP515 (“Walz”, Германия). Эксперименты проводились по протоколу, описанному Dmitrieva с соавт. [22], основанному на методике Schreiber и Klughammer [23]. Перед проведением измерений растения в течение 1 ч адаптировали к темноте. После включения измеряющего света (PML, 515 и 550 нм) с интенсивностью 24 мкЕ последовательно с интервалом в 30 с подавали три вспышки красного насыщающего света (630 нм, 5000 мкЕ, 800 мс). По кинетике падения сигнала рассчитывали экспоненциальную и линейную скорость синтеза АТФ согласно Dmitrieva et al. [22] и Sukhov et al. [24]. Затем после 10 с темноты на лист подавали красный актиничный свет (630 нм, 430 мкЕ) на протяжении 10 мин. После выключения актиничного света в течение 5 мин регистрировали кинетику быстрой темновой релаксации ESC. Амплитуду относительного электрохромного сдвига (ECS_{pmf} , P515), а также двух его компонентов — $ECS_{\Delta\psi}$ и $ECS_{\Delta pH}$ определяли согласно протоколам Dmitrieva et al. [22] и Sukhov et al. [24]. Измерения были выполнены в 6-кратной биологической повторности для каждого генотипа и каждого варианта воздействия.

Определение содержания АТФ проводили в тканях 16-дневных проростков, выращенных в стерильной фитагелизированной MC1 среде. Для создания солевого стресса раствор 100 мМ NaCl в объеме 10 мл наносили дозатором на поверхность среды, в которой выращивались проростки. Солевой раствор мгновенно абсорбировался средой и не создавал эффекта затопления. В качестве положительного фармакологического контроля использовали аппликацию на поверхность среды 10 мл раствора олигомицина (“Serva”, Германия) в концентрации 10 мкМ, которая, как было показано ранее, эффективно ингибирует митохондриальное дыхание, но не фотосинтез [25]. Через 16 ч инкубации с солевым раствором или 2 ч инкубации с раствором олигомицина проростки собирали, готовили 30 мг навески, а затем АТФ-содержащие экстракты по методу Lundin и Thore [26] и Surova с соавт. [27] с небольшими модификациями. Навеску растительного материала (30 мг) помещали в 1.5 мл пробирку типа Эппендорф и гомогенизировали микропестиком, непрерывно охлаждая пробирку в жидком азоте. К гомогенату добавляли 60 мкл двухкомпонентного буфера (0.51 М ТХУ и 17 мМ ЭДТА) и оставляли при +4°C на 15 мин в темноте. Далее для нейтрализации ТХУ добавляли 9.24 мкл 3 М КОН. Экстракты центрифугировали в течении 10 мин при 12000 g на центрифуге Sigma 1-14K (Германия) и отбирали супернатант для исследования. С помощью набора ATP Determination Kit (“ThermoFisher Sci-

entific”, США) в полученных экстрактах на мульти-модальном ридере Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (“ThermoFisher”, США) на длине волны 560 нм проводили детекцию интенсивности люминесценции люциферин-люциферазной реакции, а затем с использованием калибровочной кривой (диапазон детектируемых концентраций от 0.1 нМ до 500 нМ) рассчитывали абсолютное содержание АТФ в опытных образцах. Эксперименты были выполнены в 5-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторностях по каждому генотипу и экспериментальному воздействию.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы R version 4.1.2 (2021-11-01) — “Bird Hippie” Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64. Достоверность различий в относительном уровне транскриптов генов интереса определяли с помощью t-критерия Стьюдента, уровень значимости $P \leq 0.05$. Достоверность различий между выборками по значениям других параметров оценивали методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки (Tukey HSD test), уровень значимости $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень экспрессии KIN10 и KIN11 в проростках и взрослых растениях арабидопсиса

При выращивании в оптимальных условиях растения *KIN10-OX* имеют ярко выраженные фенотипические изменения на стадии проростков [2, 17], тогда как для растений *KIN10-RNAi* не описаны какие-либо особенности фенотипа, обусловленные подавлением функций SnRK1, ни на одной из стадий развития [2, 17]. Для того чтобы подтвердить стабильность экспрессии трансгенов, отвечающих за повышение и подавление уровня экспрессии *KIN10* в листьях взрослых растений арабидопсиса *KIN10-OX* и *KIN10-RNAi*, а также показать, что изменения в уровнях экспрессии *KIN10* не скомпенсированы изменениями экспрессии *KIN11*, был проведен ПЦР-РВ анализ накопления транскриптов соответствующих генов. Результаты представлены на рисунке 1. Показано, что в листьях дикого типа *Ler* уровень относительного содержания транскриптов *KIN10* оказался значительно выше, чем в проростках (рис. 1а), в то время как экспрессия *KIN11* не отличалась (рис. 1д). Экспрессия *KIN10* в проростках и листьях взрослых растений *KIN10-OX* в несколько раз превысила таковую в растениях дикого типа *Ler* (рис. 1а, г). Уровень *KIN10* транскриптов в проростках и листьях *KIN10-RNAi* оказался достоверно ниже, чем у дикого типа *Ler* на обеих стадиях развития растений (рис. 1а–в). Экс-

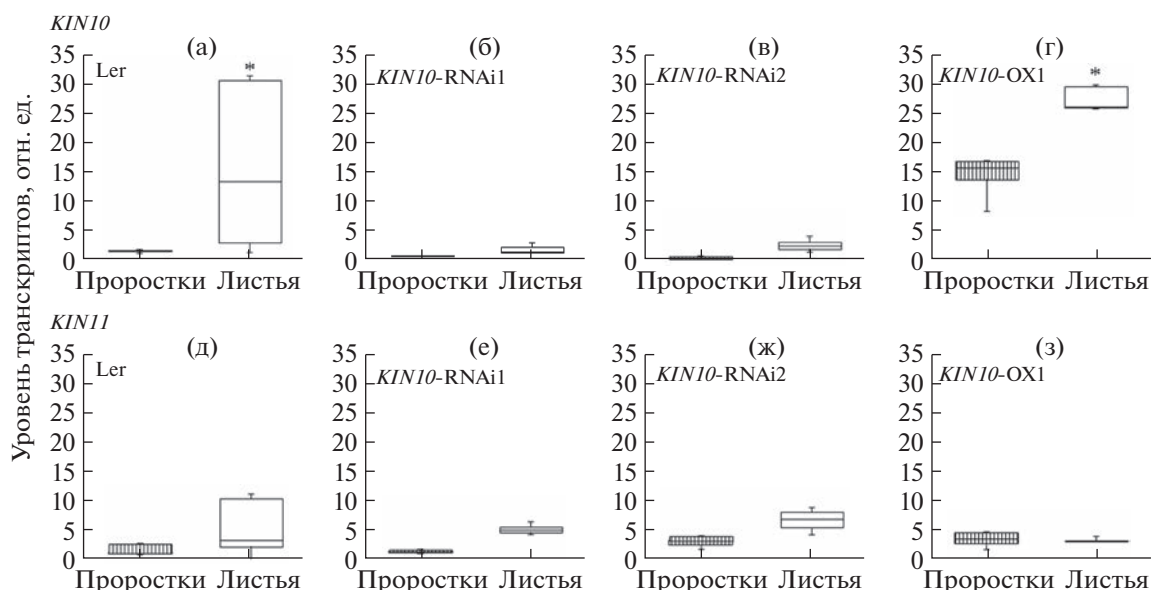


Рис. 1. Относительные уровни транскриптов *KIN10* и *KIN11* в проростках и листьях взрослых растений арабидопсиса дикого типа *Ler* (а, д), нокдаун-линий *KIN10-RNAi1* (б, е) и *KIN10-RNAi2* (в, ж), а также линии-сверхэкспрессора *KIN10-OX1* (г, з), где а, б, в, г — относительный уровень экспрессии *KIN10*; д, е, ж, з — относительный уровень экспрессии *KIN11*. Достоверность различий определяли с помощью t-теста Стьюдента. * — достоверные отличия относительного количества транскриптов гена интереса в листьях и в проростках одного и того же генотипа.

прессия *KIN11* достоверно не различалась у всех изученных генотипов арабидопсиса (рис. 1д–з).

Фенотипические изменения растений под действием солевого стресса

У растений *Arabidopsis* дикого типа *Ler* на третьи сутки умеренного солевого стресса происходило появление слабого хлороза и скручивание отдельных листьев. К пятым суткам эксперимента данные фенотипические изменения усиливались (рис. 2а–в). Сходные признаки влияния стресса развивались и у растений со сверхэкспрессией *KIN10* (*KIN10-OX1*, *KIN10-OX2*), но хлороз был отмечен на третьи сутки, а скручивание листьев только на пятые сутки засоления (рис. 2ж–и). В линиях со сниженной экспрессией *KIN10* (*KIN10-RNAi1*, *KIN10-RNAi2*) не было выявлено морфологических изменений листьев, связанных со стрессовым воздействием (рис. 2г–е).

Изменения фотохимической активности фотосистем II и I на фоне солевого стресса

Изучили изменения важнейших показателей фотохимической активности фотосистем: эффективные квантовые выходы ФСII и ФСИ ($Y(II)$ и $Y(I)$), а также $Y(NPQ)$ и $Y(NO)$ в диапазоне интенсивности актиничного света от 0 до $837 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (в ходе т.н. световых кривых) в листьях растений арабидопсиса в оптимальных контрольных условиях и под действием солевого

стресса через трое и пять суток от начала полива раствором Хогланда с добавлением 100 мМ NaCl (рис. 3–5).

В листьях растений дикого типа *Ler* происходило достоверное снижение реального квантового выхода $Y(II)$ при освещении средними интенсивностями актиничного света (107 , 138 , 228 , $351 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) на третьи и пятые сутки солевого стресса (рис. 3а). В листьях двух линий сверхэкспрессоров *KIN10-OX* обнаружено достоверное увеличение $Y(II)$ на третьи сутки засоления и снижение данного параметра на пятые сутки засоления до значений у растений в контрольных условиях (рис. 3г, д). У растений с нокдауном гена каталитической субъединицы *KIN10* либо не наблюдалось изменений в $Y(II)$ (в линии *KIN10-RNAi1*), либо происходило снижение $Y(II)$ к пятым суткам засоления (в линии *KIN10-RNAi2*) (рис. 3б, в).

Квантовый выход ФСИ достоверно уменьшался под действием засоления в диком типе *Ler* (в диапазоне значений 107 – 351 мкМ фотонов) к третьим суткам засоления и не возвращался к уровню в контроле к пятым суткам солевого стресса (рис. 4а). В листьях растений *KIN10-OX1* и *KIN10-OX2* происходило увеличение показателя $Y(I)$ на третьи сутки солевого стресса, а затем наблюдалось снижение активности ФСИ до уровня в контроле во всем диапазоне интенсивности освещения (рис. 4г, д). У растений с подавленной активностью *KIN10* показано либо отсутствие влияния засоления на $Y(I)$, либо достоверное снижение зна-

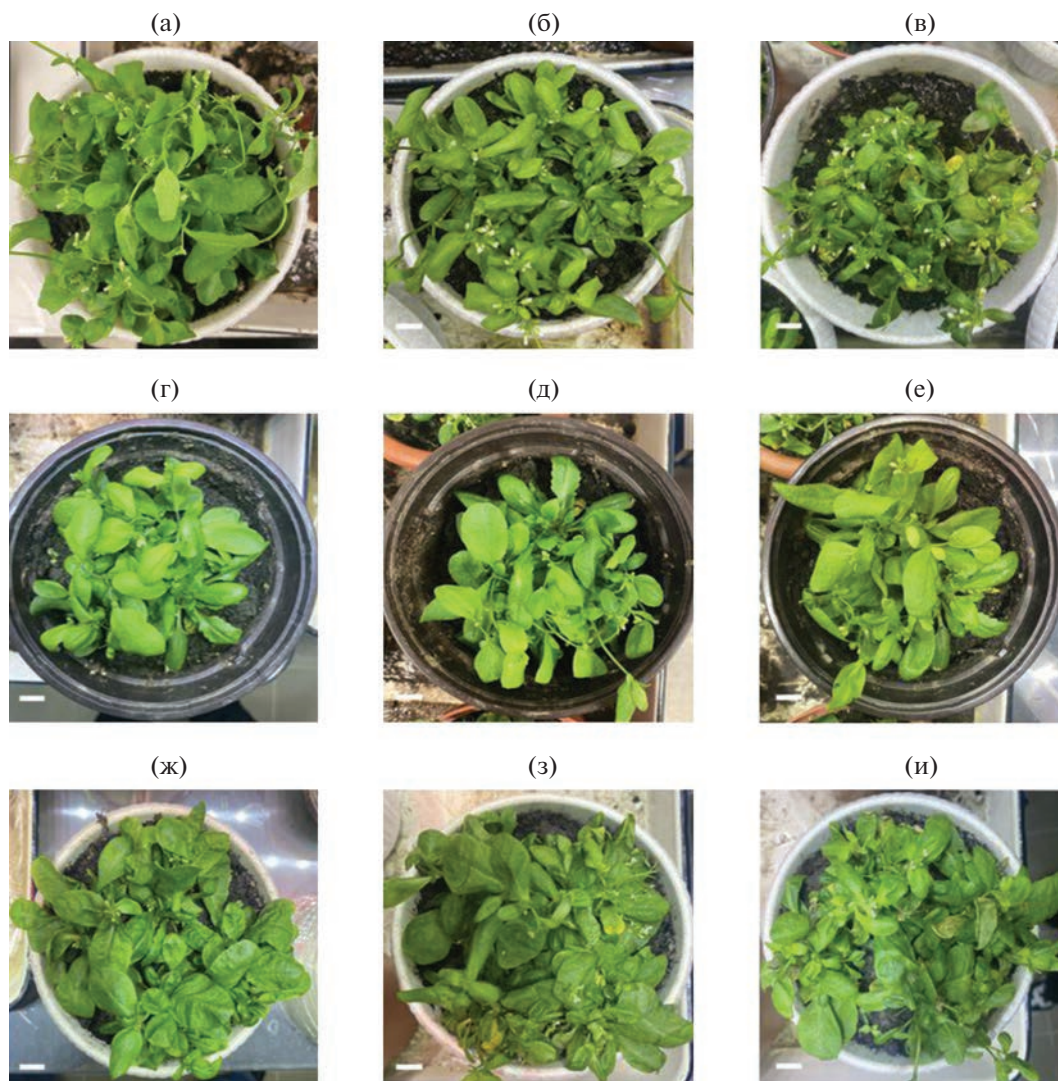


Рис. 2. Фенотипические изменения растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а, б, в), нокадаун-линии *KIN10-RNAi1* (г, д, е) и линии-сверхэкспрессора *KIN10-OX1* (ж, з, и) при хроническом засолении, где а, г, ж — фотографии растений на первые сутки засоления; б, д, з — на третьи сутки засоления; в, е, и — на пятые сутки засоления. Масштабная линейка: 1 см.

чений этого показателя на фоне солевого стресса (*KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2* соответственно) (рис. 4б, в).

Оценили также влияние засоления на квантовый выход регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции $Y(NPQ)$ как одного из важнейших механизмов предотвращения разрушения ФСII от избытка поглощенных квантов света (рис. 5). Оказалось, что в листьях арабидопсиса дикого типа Ler происходило достоверное повышение квантового выхода $Y(NPQ)$ к третьим суткам солевого стресса (рис. 5а). В листьях обеих линий *KIN10-OX* обнаружено снижение тепловой диссипации энергии к третьим суткам засоления (рис. 5г, д). В линиях *KIN10-RNAi* уровень $Y(NPQ)$ либо не изменялся, либо повышал-

ся к пятым суткам засоления (*KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2*, соответственно) (рис. 5б, в). Изменений квантового выхода нерегулируемого тушения флуоресценции $Y(NO)$ не выявлено ни в одной из исследуемых линий арабидопсиса (данные не показаны), что свидетельствует об отсутствии структурных нарушений пула ФСII под действием солевого стресса.

Электрохимический градиент и скорость синтеза АТФ

Для того чтобы сравнить относительную энергизованность тилакоидных мембран и эффективность работы АТФ-синтазы в хлоропластах линий арабидопсиса с различным уровнем экспрессии

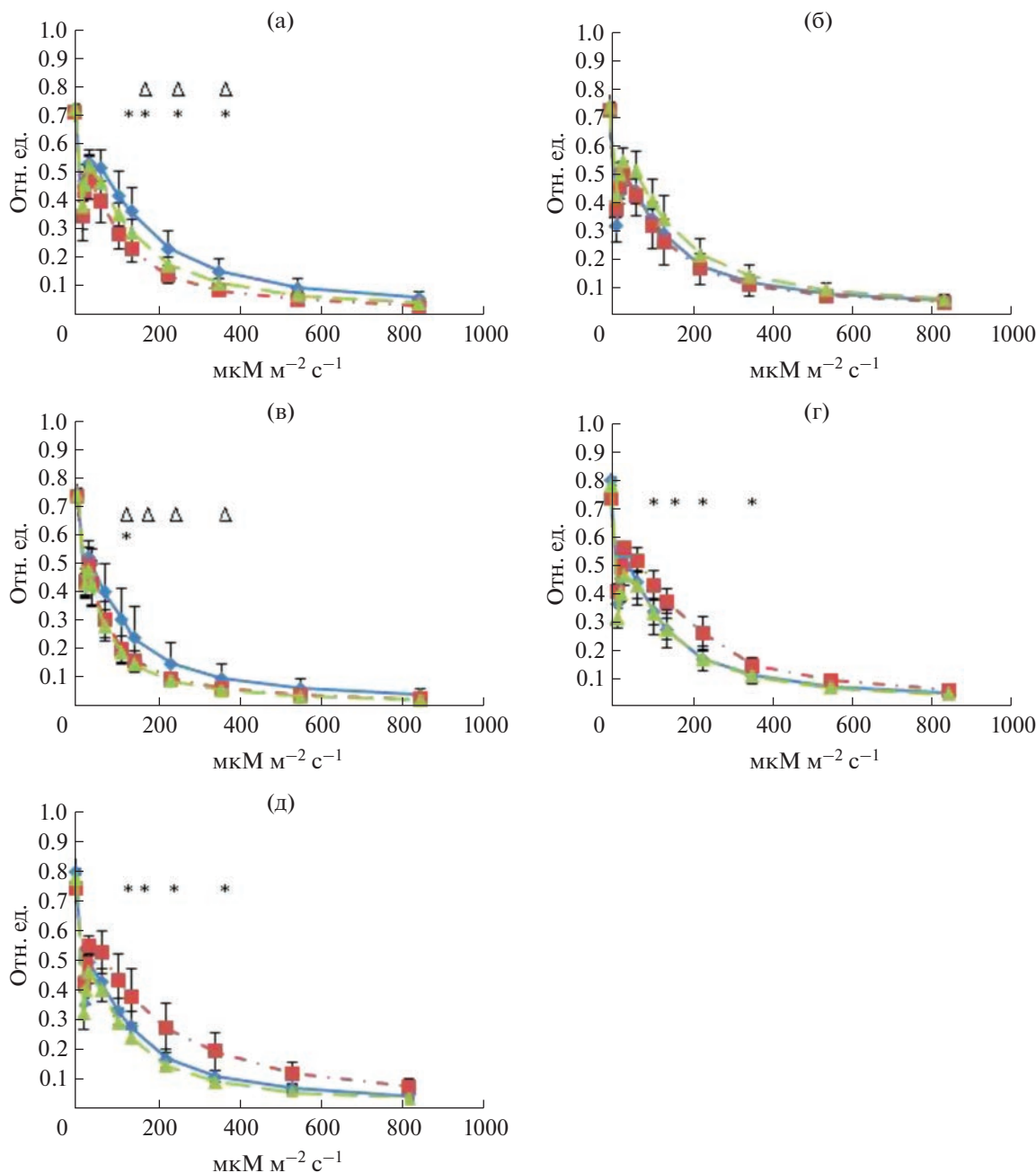


Рис. 3. Зависимость квантового выхода ФСII ($Y(II)$) от интенсивности света (“световая кривая”), измеренная в листьях растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а), нокадаун-линий *KIN10*-RNAi1 (б) и *KIN10*-RNAi2 (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10*-OX1 (г) и *KIN10*-OX2 (д), в оптимальных условиях и на фоне засоления. Условные обозначения на графиках: сплошная линия с маркерами-ромбами — значения, полученные на растениях в контрольных условиях; штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами — значения, полученные на третьи сутки хронического засоления растений; пунктирная линия с маркерами-треугольниками — значения, полученные на пятые сутки хронического засоления растений; * — достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 сутки солевого стресса согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$; Δ — достоверные различия между измерениями в контроле и на пятые сутки солевого стресса согласно ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$. На графиках показаны средние арифметические значения десяти независимых измерений, выполненных на 10 листьях разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в $\mu\text{M фотонов м}^{-2} \text{с}^{-1}$; по оси ординат — значения параметра $Y(II)$ в относительных единицах.

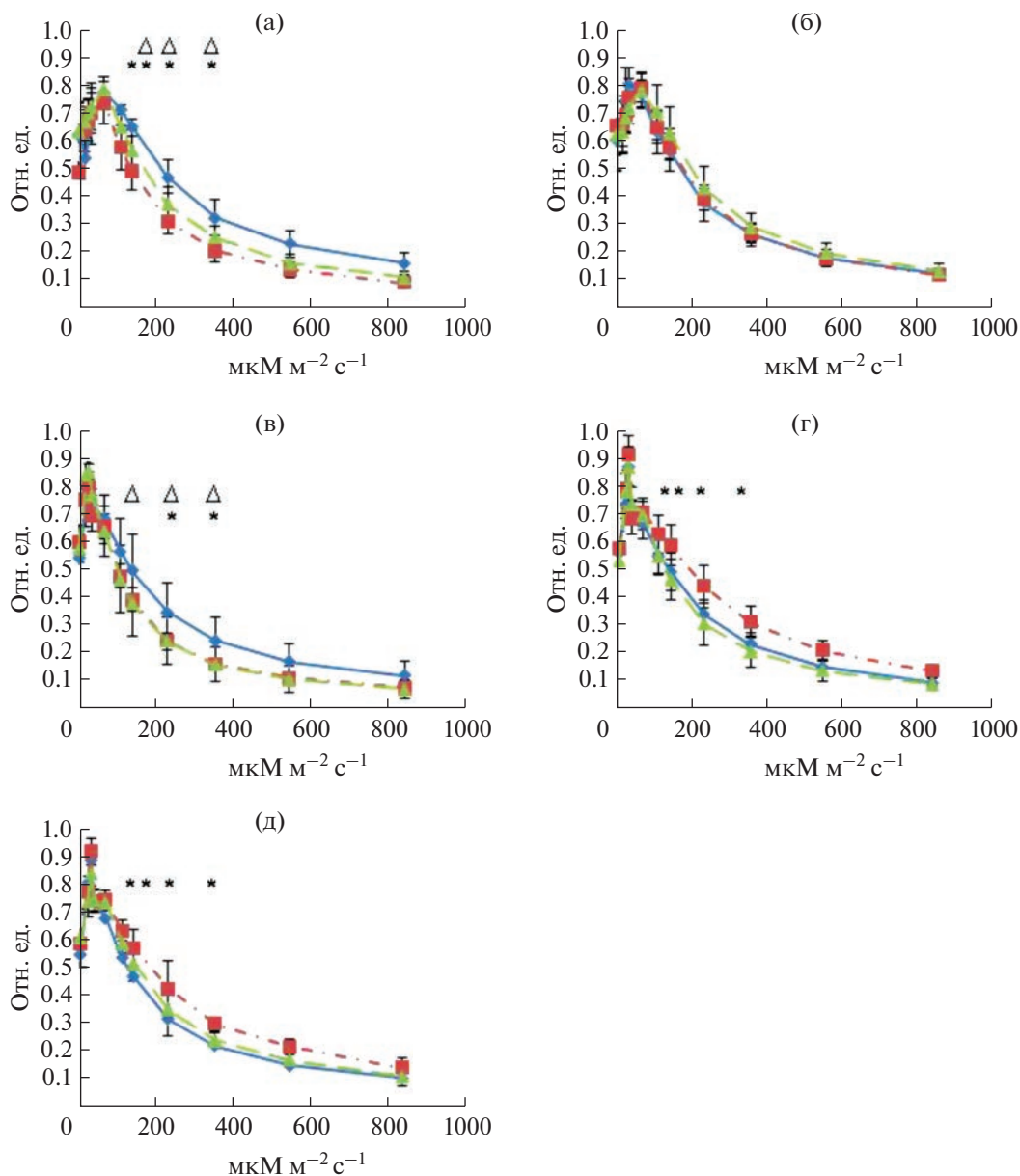


Рис. 4. Зависимость квантового выхода ФСИ (Y(I)) от интенсивности света (“световая кривая”), измеренная в листьях дикого типа Ler (а), нокдаун-линий *KIN10*-RNAi1 (б) и *KIN10*-RNAi2 (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10*-OX1 (г) и *KIN10*-OX2 (д), в оптимальных условиях и на фоне засоления. Условные обозначения на графиках: сплошная линия с маркерами-ромбами — значения, полученные на растениях в контрольных условиях; штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами — значения, полученные на третьи сутки хронического засоления растений; пунктирная линия с маркерами-треугольниками — значения, полученные на пятые сутки хронического засоления растений; * — достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 сутки солевого стресса согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$; Δ — достоверные различия между измерениями в контроле и на пятые сутки солевого стресса согласно ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$. На графиках показаны средние арифметические значения десяти независимых измерений, выполненных на 10 листьях разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в $\mu\text{M фотонов м}^{-2} \text{с}^{-1}$; по оси ординат — значения параметра Y(I) в относительных единицах.

KIN10 исследовали амплитуду светоиндуцированной протон-движущей силы ECS_{pmf} , а также относительные величины двух ее компонентов: градиента трансмембранного электрического потенциала ($\Delta\Psi$) и градиента концентрации протонов (ΔpH)

(рис. 6а–в). У сверхэкспрессоров (*KIN10*-OX1-2) по сравнению с другими исследуемыми линиями обнаружена выраженная тенденция к более низкому уровню электрического градиента на мембранах хлоропластов (рис. 6б). В то же время

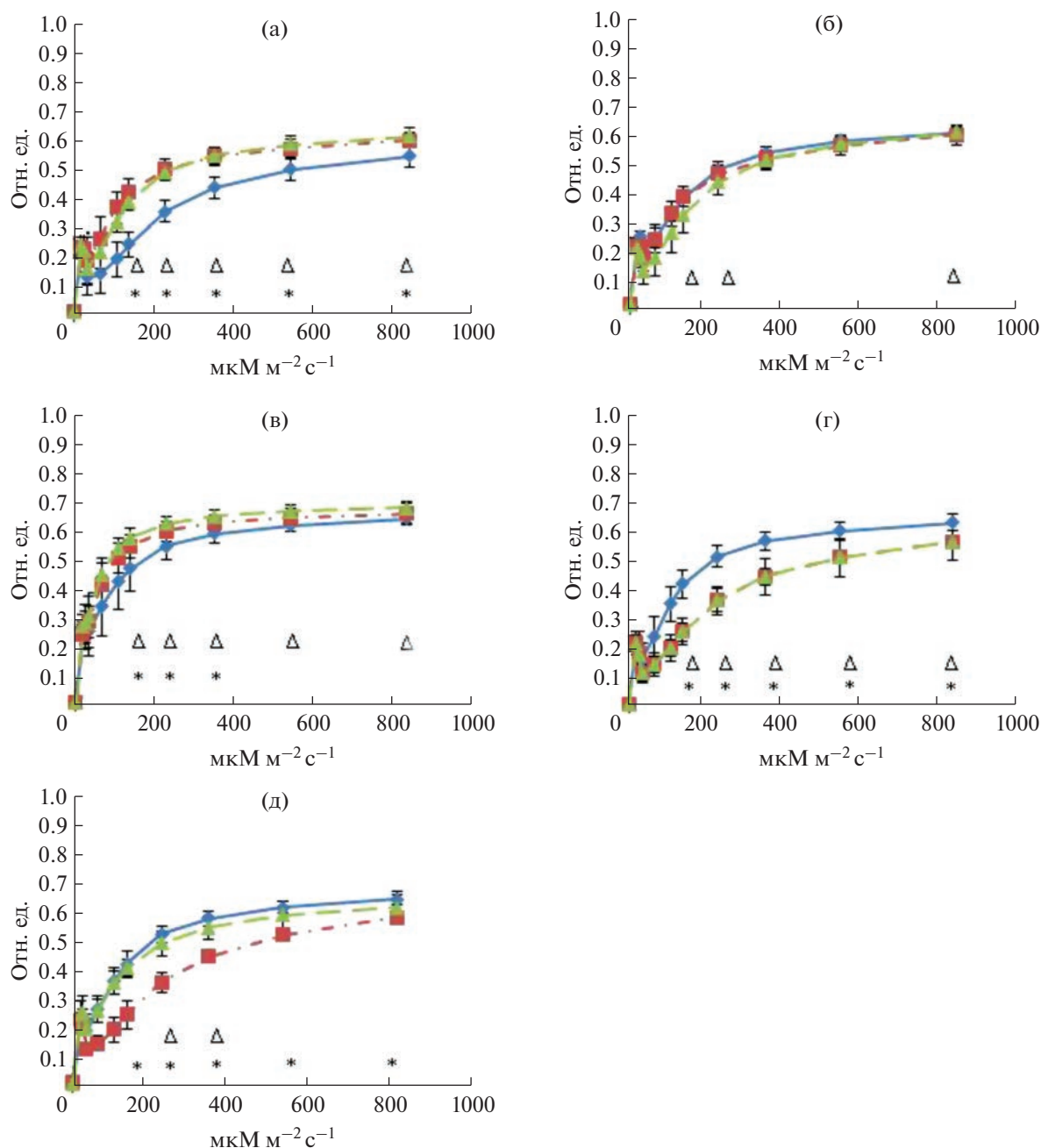


Рис. 5. Зависимость квантового выхода нефотохимического тушения флуоресценции ($Y(NPQ)$) от интенсивности света ("световая кривая"), измеренная в листьях дикого типа Ler (а), нокдаун-линий *KIN10-RNAi1* (б) и *KIN10-RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10-OX1* (г) и *KIN10-OX2* (д), в оптимальных условиях и на фоне засоления. Условные обозначения на графиках: сплошная линия с маркерами-ромбами — значения, полученные на растениях в контрольных условиях; штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами — значения, полученные на третьи сутки хронического засоления растений; пунктирная линия с маркерами-треугольниками — значения, полученные на пятые сутки хронического засоления растений; * — достоверные различия между измерениями в контроле и на третьи сутки солевого стресса согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$; Δ — достоверные различия между измерениями в контроле и на пятые сутки солевого стресса согласно ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$. На графиках показаны средние арифметические значения десяти независимых измерений, выполненных на 10 листьях разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в $\mu\text{M фотонов м}^{-2} \text{с}^{-1}$; по оси ординат — значения параметра $Y(NPQ)$ в относительных единицах.

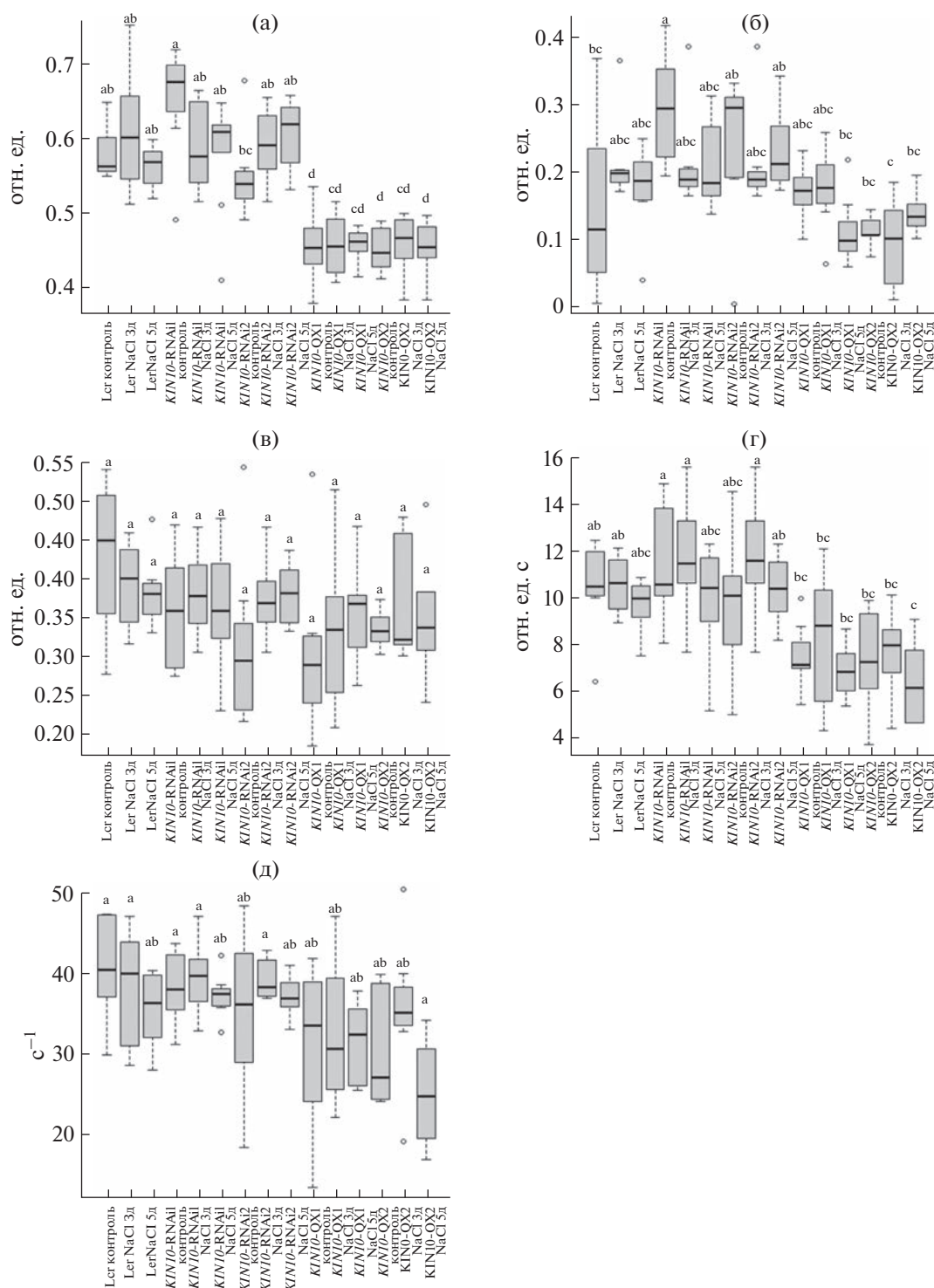


Рис. 6. Относительные уровни электрохимического градиента ECS_{pmf} (а), градиента электрического потенциала $ECS_{\Delta\psi}$ (б), градиента концентрации протонов $ECS_{\Delta pH}$ (в), линейной (г) и экспоненциальной (д) скорости синтеза АТФ в листьях растений дикого типа Ler, линий-сверхэкспрессоров *KIN10-OX1* и *KIN10-OX2*, а также линий с подавленной экспрессией *KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2* на фоне засоления. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. “Контроль” – значения показателя в оптимальных условиях роста, “NaCl 3д” и “NaCl 5д” – значения показателя на третьи и пятые сутки хронического засоления. Достоверность различий оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$.

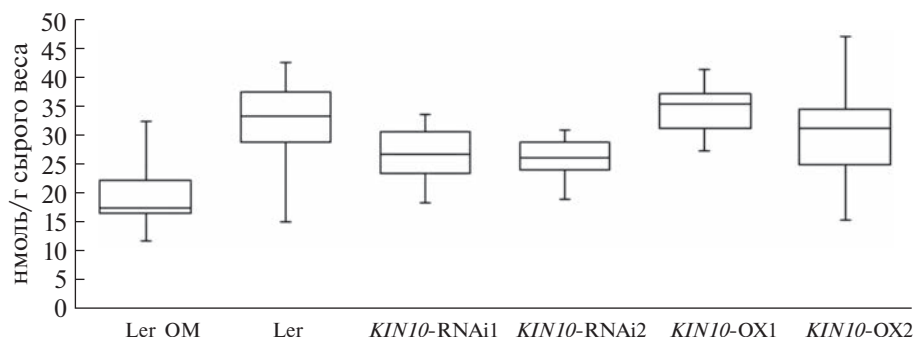


Рис. 7. Уровни АТФ в проростках дикого типа Ler, линий-сверхэкспрессоров *KIN10* (*KIN10-OX1* и *KIN10-OX2*) и линий с подавленной экспрессией *KIN10* (*KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2*) после 16 ч солевого стресса. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Эксперименты выполнены в пяти биологических и трех технических повторностях. OM – растения, обработанные олигомицином. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Достоверность различий оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$.

статистически достоверных отличий в амплитуде $ECS_{\Delta\psi}$ и $ECS_{\Delta pH}$ выявить не удалось и таким образом снижение общей амплитуды pmf в линиях сверхэкспрессоров не может быть объяснено специфическим снижением одного из двух компонентов pmf (рис. 6б, в). В *KIN10-OX1-2* была также выявлена тенденция к сниженной, относительно других линий, линейной скорости АТФ, которая напрямую зависит от протон-движущей силы, тогда как экспоненциальная скорость, зависящая от концентрации аденозинфосфатов и АТФ синтазы, оказалась сходной с таковой в других линиях арабидопсиса (рис. 6г, д).

Супрессия *KIN10* в нокаутных линиях арабидопсиса не вызывала достоверных изменений в амплитуде протон-движущей силы и двух ее компонентов $\Delta\psi$ и ΔpH по сравнению с растениями дикого типа ни в контрольных условиях, ни под действием засоления, за исключением хлоропластов *KIN10-RNAi1*, на мембранах которых в контрольных условиях генерировался более высокий градиент трансмембранного электрического потенциала по сравнению с другими линиями арабидопсиса (рис. 6б, в).

Уровень продукции АТФ в проростках арабидопсиса

Сравнили содержание АТФ в проростках дикого типа арабидопсиса, линий со сниженной и повышенной экспрессией *KIN10* в контрольных условиях и под действием солевого стресса. Для того чтобы оценить вклад митохондриального дыхания в продукцию АТФ в проростках, использовали ингибитор митохондриальной АТФ-синтазы олигомицин. В проростках всех изученных линий арабидопсиса содержание АТФ оказалось сходным (рис. 7). Показано, что примерно половина от суммарного содержания АТФ в

проростках генерируется в результате окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Солевой стресс оказывает комплексный негативный эффект на метаболизм растений, который связан с сокращением поглощения воды вследствие повышенного осмотического давления в ризосфере, с токсическим эффектом накопления катионов натрия и анионов хлора, а также с развитием окислительного стресса [28, 29]. Одной из мишеней хронического солевого стресса у растений является фотосинтетическая функция хлоропластов [30]. Для поддержания фотосинтеза как важнейшего энергопродуцирующего процесса у растений имеется набор адаптивных защитных механизмов, развивающихся в стрессовых условиях на уровне фотосинтетических тилакоидных мембран хлоропластов. Пути регуляции фотосинтетической способности растений со стороны энергетического сенсора растений – центральной регуляторной SnRK1-киназы – в условиях засоления, остаются неизвестными. В данном исследовании мы применили хронический солевой стресс для выявления взаимосвязи между уровнем активности SnRK1-киназы, который был генетически детерминирован уровнем транскрипции каталитической субъединицы фермента в разных линиях арабидопсиса (Ler, сверхэкспрессоры *KIN10-OX1-2*, нокауты *KIN10-RNAi1-2*) и механизмами адаптации фотосинтетической активности у растений арабидопсиса. В листьях взрослых растений с помощью неинвазивного высокочувствительного метода импульсной модулирующей и прямой флуориметрии хлорофилла *a* нами изучена динамика показателей фотохимических реакций фотосинтеза; методом регистрации электро-

хромного сдвига поглощения пигментов листа проведена оценка процессов генерации электрохимического градиента и АТФ-синтазной активности. Дополнительно в проростках биOLUMИ-несцентным методом исследовали содержание АТФ, которое коррелирует с общим энергетический статусом растительных клеток.

По таким фенотипическим признакам стресса как хлороз и скручивание листовых пластинок, наиболее чувствительными к засолению оказались растения арабидопсиса с нормальным и повышенным уровнем экспрессии *KIN10*. Линии с супрессией функции SnRK1-киназы за пять суток умеренного засоления фенотипически не изменялись. Ранее в работах [17, 18] была показана сниженная устойчивость *KIN10*-RNAi к абиотическим стрессорам, что, на первый взгляд, противоречит полученным нами данным. Однако, комплексная оценка фотосинтетической активности листьев исследуемых генотипов на фоне солевого стресса привела к выводам в пользу развития адаптивных изменений в линиях со сверхактивированным пулом SnRK1-киназы (*KIN10*-OX) и слабой выраженностью или полным отсутствием таких изменений у растений *KIN10*-RNAi с подавлением функций SnRK1. Так, за первые трое суток солевого стресса в линиях *KIN10*-OX происходило увеличение реальных квантовых выходов ФСП и ФСІ, и при этом не развивалось стресс-индуцированное нефотохимическое тушение флуоресценции, ассоциированное с регулируемым формированием центров диссипации энергии. Важно отметить, что квантовые выходы ФСП и ФСІ в линиях дикого типа и *KIN10*-RNAi-2 под действием засоления не изменялись или снижались с одновременным увеличением квантового выхода регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции.

Анализ показателей, коррелирующих с общим энергетическим статусом растений, показал, что генотип-специфичное изменение уровня SnRK1-киназы в линиях Leg, *KIN10*-OX и *KIN10*-RNAi ни в благоприятных, ни в стрессовых условиях не приводило ни к изменениям содержания АТФ в проростках, ни к существенному изменению работы АТФ-синтазы. В то же время нами впервые выявлена функциональная особенность работы электрон-транспортной цепи хлоропластов линий сверхэкспрессоров *KIN10*, состоящая в относительно низкой амплитуде формирующейся на свету транстилакоидной протон-движущей силы pmf. Расчет относительных изменений двух компонент pmf показал, что снижение амплитуды pmf, вероятнее всего, связано с низким градиентом электрического потенциала $\Delta\psi$. Известно, что генерация протон-движущей силы играет критически важную роль в поддержании и регуляции фотосинтеза, поскольку именно электрохимический градиент протонов выступает связующим процессом

между абсорбцией энергии света и использованием поглощенной энергии на синтез АТФ [31]. Ранее низкая способность к генерации $\Delta\psi$ на высоком свете была описана у мутанта арабидопсиса *pgr5* [32], мутанта-нокаута *chl1-3* с заблокированным биосинтезом хлорофилла *b* [22], а также мутантов с нарушением транспорта катионов и анионов через тилакоидную мембрану, например, по K^+/H^+ антипортеру *kea3* и фосфатному транспортеру *ph4;1* [33]. У исследуемых нами линий сверхэкспрессоров, в отличие от вышеперечисленных мутантов, снижение электрохимического градиента не было связано с нарушением генерации или повышением доли ΔpH компоненты в амплитуде pmf, что также коррелировало с сохранением способности *KIN10*-OX к развитию нефотохимического тушения флуоресценции. Известно, что поддержание сниженного градиента электрического потенциала в условиях флуктуирующего света является защитным механизмом, препятствующим развитию фотоповреждения ФСII [34]. SnRK1-киназа является важнейшим интегратором сигналов и центральным регулятором стрессовых ответов растений, который поддерживает развитие защитных процессов. На основании полученных данных мы предполагаем, что в линиях со сверхэкспрессией SnRK1 индуцирован неизученный пока механизм, изменяющий потоки ионов через тилакоидные мембраны на свету, что может оказывать защитное действие при накоплении ионов натрия и хлора в хлоропластах и обеспечивать поддержание активности фотосистем при засолении. Мы предполагаем также, что увеличение активности SnRK1-киназы в линиях *KIN10*-OX приводит к усилению процессов репарации хлоропластов, в первую очередь с участием автофагии [17, 18]. Таким образом, нами показаны изменения фотохимической активности хлоропластов, ассоциированные с конститутивной активацией SnRK1-киназы в двух линиях, сверхэкспрессирующих каталитическую субъединицу *KIN10*. Обнаруженные особенности световых реакций фотосинтеза сохранялись в этих линиях и при благоприятных условиях роста, и при адаптации к солевому стрессу. Подавление функции SnRK1-киназы методом замалчивания РНК-интерференцией в линиях арабидопсиса, напротив, приводило к отсутствию выраженного ответа на солевой стресс на уровне фотохимической активности хлоропластов. Согласно последним результатам изучения интерактивных и фосфопротеомных массивов данных [35] показано взаимодействие SnRK1-киназы с транскрипционным и трансляционным аппаратами клетки, протеинкиназами и фосфатазами, системами убиквитинирования и сумоилирования белков, цитоскелетом, системой внутриклеточного транспорта белков и автофагией. Конкретные молекулярные мишени SnRK1-зависимой сигнальной сети, которые

участвуют в регуляции энергетического метаболизма хлоропластов, остаются малоизученными. Полученные нами данные на модели растений арабидопсиса с измененным уровнем активности SnRK1-киназы представляются перспективными для проведения дальнейших исследований регуляции функций хлоропластов со стороны центрального энергетического сенсора SnRK1 и выявления путей регуляции энергетического статуса растительных клеток [4, 5, 36].

Авторы статьи выражают благодарность Dr. Filip Rolland (Catholic University of Leuven, Belgium) за любезно предоставленные семена линий *KIN10-OX* и *KIN10-RNAi*. Мы искренне признательны Dr. Katharina Pawlowski (University of Stockholm, Sweden) за критическое обсуждение результатов и рукописи статьи. Благодарим н.с. В.А. Дмитриеву (лаборатория молекулярной и экологической физиологии БИН РАН) за помощь в освоении метода электрохромного сдвига поглощения пигментов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-90138.

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. Shi L., Wu Y., Sheen J. TOR signaling in plants: conservation and innovation // *Development*. 2018. V. 145: dev160887. <https://doi.org/10.1242/dev.160887>
2. Baena-González E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling // *Nature*. 2007. V. 448. P. 938.
3. Margalha L., Confraria A., Baena-González E. SnRK1 and TOR: modulating growth–defense trade-offs in plant stress responses // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 2261.
4. Nukarinen E., Nägele T., Pedrotti L., Wurzinger B., Mair A., Landgraf R., Börnke F., Hanson J., Teige M., Baena-González E., Dröge-Laser W., Weckwerth W. Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation // *Sci Rep*. 2016. V. 6: 31697. <https://doi.org/10.1038/srep31697>
5. Wurzinger B., Nukarinen E., Nägele T., Weckwerth W., Teige M. The SnRK1 kinase as central mediator of energy signaling between different organelles // *Plant Physiol*. 2018. V. 176. P. 1085.
6. Bakshi A., Moin M., Kumar M.U., Reddy A.B.M., Ren M., Datla R., Siddiq E.A., Kirti P.B. Ectopic expression of *Arabidopsis* Target of Rapamycin (AtTOR) improves water-use efficiency and yield potential in rice // *Sci Rep*. 2017. V. 7: 42835. <https://doi.org/10.1038/srep42835>
7. Dong P., Xiong F., Que Y., Wang K., Yu L., Li Z., Ren M. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci*. 2015. V.6:677. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00677>
8. Brunkard J.O., Xu M., Scarpin M.R., Chatterjee S., She-myakina E.A., Goodman H.M., Zambryski P. TOR dynamically regulates plant cell–cell transport // *PNAS*. 2020. V. 117. P. 5049.
9. Gutierrez-Beltran E., Crespo J.L. Compartmentalization, a key mechanism controlling the multitasking role of the SnRK1 complex // *J. Exp. Bot.* 2022. V. 73. P. 7055.
10. Zhang Y., Primavesi L.F., Jhurreea D., Andralojc P.J., Mitchell R.A., Powers S.J., Schluepmann H., Delatte T., Winkler A., Paul M.J. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate // *Plant Physiol*. 2009. V. 149. P. 1860.
11. Yuan S., Zhang Z.-W., Zheng C., Zhao Z.-Y., Wang Y., Feng L.-Y., Niu G., Wang C.-Q., Wang J.-H., Feng H., Xu F., Bao F., Hu Y., Cao Y., Ma L., Wang H., Kong D.-D., Xiao W., Lin H.-H., He Y. *Arabidopsis* Cryptochrome 1 functions in nitrogen regulation of flowering // *PNAS*. 2016. V. 113. P. 7661.
12. Ramon M., Dang T.V.T., Broeckx T., Hulsmans S., Crepin N., Sheen J., Rolland F. Default activation and nuclear translocation of the plant cellular energy sensor SnRK1 regulate metabolic stress responses and development // *Plant Cell*. 2019. V. 31. P. 1614.
13. Ruiz-Gayosso A., Rodríguez-Sotres R., Martínez-Barajas E., Coello P. A role for the carbohydrate-binding module (CBM) in regulatory SnRK1 subunits: the effect of maltose on SnRK1 activity // *Plant J*. 2018. V. 96. P. 163.
14. Wang H., Han C., Wang J.G., Chu X., Shi W., Yao L., Chen J., Hao W., Deng Z., Fan M., Bai M.-Y. Regulatory functions of cellular energy sensor SnRK1 for nitrate signalling through NLP7 repression // *Nat. Plants*. 2022. V. 8. P. 1094.
15. Martínez-Barajas E., Coello P. How do SnRK1 protein kinases truly work? // *Plant Sci*. 2020. V. 291: 110330. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110330>
16. Zúñiga-Sánchez E., Rodríguez-Sotres R., Coello P., Martínez-Barajas E. Effect of catalytic phosphorylation on the properties of SnRK1 from *Phaseolus vulgaris* embryos // *Physiol. Plant*. 2018. V. 165. P. 632.
17. Chen L., Su Z.-Z., Huang L., Xia F.-N., Qi H., Xie L.-J., Xiao S., Chen Q.-F. The AMP-activated protein kinase KIN10 is involved in the regulation of autophagy in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8:1201. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01201>
18. Soto-Burgos J., Bassham D.C. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS ONE* 2017. V. 12:e0182591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182591>
19. Hoagland D.R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil // *Circ. - Calif. Agric. Exp. Stn*. 1950. V. 347. P. 1.
20. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-

- chloroform extraction // *Anal Biochem.* 1987. V. 162. P. 156.
21. *Schmittgen T.D., Livak K.J.* Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nat. Protocols.* 2008. V. 3. P. 1101.
 22. *Dmitrieva V.A., Domashkina V.V., Ivanova A.N., Sukhov V.S., Tyutereva E.V., Voitsekhovskaja O.V.* Regulation of plasmodesmata in *Arabidopsis* leaves: ATP, NADPH and chlorophyll *b* levels matter // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 5534.
 23. *Schreiber U., Klughammer C.* New accessory for the DUALPAM-100: the P515/535 module and examples of its application // *PAM Application Notes.* 2008. V. 1. P. 1.
 24. *Sukhov V., Surova L., Morozova E., Sherstneva O., Vodeneev V.* Changes in H^+ -ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7:1092. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01092>
 25. *Kroemer S., Heldt H.-W.* On the role of mitochondrial oxidative phosphorylation in photosynthesis metabolism as studied by the effect of oligomycin on photosynthesis in protoplasts and leaves of barley (*Hordeum vulgare*) // *Plant Physiol.* 1991. V. 95. P. 1270.
 26. *Lundin A., Thore A.* Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay // *Appl. Microbiol.* 1975. V. 30. P. 713.
 27. *Surova L., Sherstneva O., Vodeneev V., Katicheva L., Semina M., Sukhov V.* Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves // *J. Plant Physiol.* 2016. V. 202. P. 57.
 28. *Pan T., Liu M., Kreslavski V., Zharmukhamedov S., Nie C., Yu M., Kuznetsov V., Allakhverdiev S., Shabala S.* Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2021. V.51. P. 791.
 29. *Zahra N., Al Hinai M.S., Hafeez M.B., Rehman A., Wahid A., Siddique K.H.M., Farooq M.* Regulation of photosynthesis under salt stress and associated tolerance mechanisms // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 178. P. 55.
 30. *Awlia M., Nigro A., Fajkus J., Schmoeckel S.-M., Negrão S., Santelia D., Trilek M., Tester M., Julkowska M.-M., Panzarová K.* High-throughput nondestructive phenotyping of traits that contribute to salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant Sci.* 2016. V.7:1414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01414>
 31. *Takizawa K., Cruz J.A., Kanazawa A., Kramer D.M.* The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1767. P. 1233.
 32. *Yamamoto H., Shikanai T.* PGR5-Dependent Cyclic Electron Flow Protects Photosystem I under Fluctuating Light at Donor and Acceptor Sides // *Plant Physiol.* 2019. V. 179. P. 588.
 33. *Spetea C., Herdean A., Alloreant G., Carraretto L., Finazzi G., Szabo I.* An update on the regulation of photosynthesis by thylakoid ion channels and transporters in *Arabidopsis* // *Physiol Plant.* 2017. V.161. P. 16.
 34. *Davis G.A., Kanazawa A., Schöttler M.A., Kohzuma K., Froehlich J.E., Rutherford A.W., Satoh-Cruz M., Minhas D., Tietz S., Dhingra A., Kramer D.M.* Limitations to photosynthesis by proton motive force-induced photosystem II photodamage // *Elife.* 2016. V. 5:e16921. <https://doi.org/10.7554/eLife.16921>
 35. *Jamsheer M.K., Kumar M., Srivastava V.* SNF1-related protein kinase 1: the many-faced signaling hub regulating developmental plasticity in plants // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 6042.
 36. *Tyutereva E.V., Murtuzova A.V., Voitsekhovskaja O.V.* Autophagy and the energy status of plant cells. *Russ J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 19. <https://doi.org/10.1134/S1021443722020212>

УДК 581.1

ПОВЫШЕНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ *Triticum aestivum* L. К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ С ПОМОЩЬЮ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *Bacillus subtilis*

© 2023 г. З. М. Курамшина^{а, *}, Р. М. Хайруллин^б

^аСтерлитамакский филиал Уфимского университета науки и технологий, Стерлитамак, Россия

^бИнститут биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.22 г.

После доработки 06.12.2022 г.

Принята к публикации 06.12.2022 г.

Изучено влияние солевого стресса на растения *Triticum aestivum* L., инокулированные эндофитными штаммами *B. subtilis*. Показано, что обработка *Triticum aestivum* L. эндофитными штаммами бактерий *B. subtilis* повышает устойчивость растений к стресс-фактору, снижает развитие окислительного стресса, проникновение ионов натрия в надземную часть растений. Антистрессовый эффект и способность эндофитных штаммов *B. subtilis* снижать поглощение ионов натрия растениями *Triticum aestivum* L. может быть использовано для стимуляции роста растений при выращивании их на засоленных территориях.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Bacillus subtilis*, солевой стресс, рост, антиоксидантные ферменты, фенольные соединения, малоновый диальдегид, пролин, содержание натрия и калия, антистрессовый эффект

DOI: 10.31857/S001533032260070X, EDN: IBLFFL

ВВЕДЕНИЕ

Засоление почвы становится широко распространенным явлением во многих регионах мира и представляет собой глобальную проблему для сельского хозяйства. Длительное воздействие метеорологических факторов (дождь, ветер и др.) может привести к образованию полусухих и засушливых районов с естественным засолением почв. Антропогенная деятельность человека и применение нерациональных агротехнических приемов усугубляют ситуацию [1–3].

Засоление является одним из неблагоприятных факторов внешней среды, ограничивающих продуктивность сельскохозяйственных культур. Минерализация почвы ведет к осмотическому стрессу и нарушению ионного гомеостаза. В клетках возникает дефицит ионов K^+ и одновременно происходит увеличение концентрации ионов Na^+ внутри растений, что является токсичным для растений, затрудняется поглощение других ионов и питательных веществ, снижается скорость фотосинтеза, накопление биомассы и др. [4, 5].

Ионный дисбаланс и гиперосмотическое давление при засолении почвы ведут к развитию окислительного стресса. Возникают изменения в молекулярных и биохимических путях, участвующих в стрессоустойчивости растений, что в конечном

итоге, проявляется в снижении физиологической адаптации растений [6].

Засоление почвы, таким образом, приводит к сочетанию множественных стрессов, кумулятивно действующих на растения. Снижение мобилизации питательных веществ, гормональная нестабильность, образование активных форм кислорода (АФК), ионная токсичность и осмотический стресс ведут к ингибированию роста и развития растений в условиях засоления [7, 8].

Известно, что некоторые микроорганизмы, в том числе и бактерии, стимулирующие рост (PGPB), как *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* и др., при засолении среды повышают толерантность сельскохозяйственных культур к стрессу [4, 7, 8]. Доказано, что PGPB способны синтезировать фитогормоны (ауксины, абсцизовую кислоту, гиббереллины, цитокинин) и повышать уровень эндогенных гормонов растений, активируя так называемую индуцированную системную толерантность (ИСТ). ИСТ включает изменение физиологических и биохимических процессов растения, которые смягчают негативные последствия экологических стрессов [9–11]. Применение PGPB также может вызывать усиление антиоксидантной системы для смягчения пагубного воздействия АФК. Положительные эффекты при солевом стрессе

обусловлены и продукцией бактериальной АЦК-деаминазы (1-аминоциклопропан-1-карбоксилат), что ведет к снижению уровня этилена и считается ключевым признаком смягчения стресса RGPB [9].

Многочисленные исследования свидетельствуют, что растение может легче приспосабливаться к стрессу, мутуалистически взаимодействуя с различными бактериальными популяциями, в сравнении с отсутствием подобного рода взаимоотношений с микроорганизмами [1, 2]. Усилия ученых в настоящее время направлены на поиск эффективных штаммов микроорганизмов, повышающих солеустойчивость растений, и оценку биохимических и молекулярных реакций растений, подвергшихся засолению и бактериальной инокуляции. Цель работы — изучение влияния эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ на повышение солеустойчивости растений *Triticum aestivum* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объектом исследования служили растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Омская 35). Эксперименты проводили в лабораторных условиях. Семена перед посадкой промывали в мыльной воде, стерилизовали 96%-ым этанолом в течение 1 мин, трижды ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали [16]. В экспериментах использовали бактерии *B. subtilis* штамма 26Д (коллекция ВНИИСХМ, №128) и штамма 11ВМ (ВНИИСХМ, №519). Семена обрабатывали в ламинар-боксе 20-часовой культурой бактерий, выращенной на мясопептонном агаре при +37°C. Клетки бактерий отмывали раствором 0.001 М KCl. Суспензию клеток доводили до необходимой концентрации по оптической плотности. Расход бактериальной суспензии (10^6 кл/мл) составлял 20 мкл на 1 г семян. Обработанные семена выдерживали в течение часа, затем использовали в экспериментах. Контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой.

Инокулированные и контрольные семена выращивали в вегетационных сосудах (20 × 20 см) при температуре 18–20°C при искусственном равномерном освещении (среднесуточный световой интеграл 200–250 мкмоль/(м² с)) и 16-часовом фотопериоде. Использовали чернозем выщелоченный (верхний гумусовый слой).

Солевой стресс имитировали однократным поливом почвы раствором NaCl в концентрациях 3, 4, 5, 6 г соли в 1 кг почвы после посева семян растений. Контрольные растения поливали дистиллированной водой. Через 30 сут отбирали только побеги для биохимического анализа.

Получение экстрактов из растительных тканей. Побеги растений, выращенных в почве с различ-

ной концентрацией соли, промывали в дистиллированной воде, удаляли избыток воды фильтровальной бумагой, взвешивали. Растительный материал гомогенизировали в 0.1 М К-фосфатном буфере pH 6.0 (при определении пероксидазы) или в Трис-содержащем буфере pH 7.8 (при определении каталазы и малонового диальдегида) в соотношении навеска (г) : экстрагент (мл) — 1 : 10, центрифугировали 10 мин при 3500 g на центрифуге (СМ-50, “Elmi”, Латвия). Надосадочную жидкость центрифугировали еще 10 мин при 15300 g. Надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов и малонового диальдегида.

Определение активности ферментов и малонового диальдегида. Активность пероксидазы оценивали согласно методике Хайруллина с соавторами, исходя из количества окисленного ортофенилендиамина. 1 единица активности фермента соответствовала количеству окисленного ортофенилендиамина (Sigma, США), дающего в описанных условиях приращение оптической плотности $\Delta A_{492} = 1$ за 1 с, приведенное к сырой массе навески (мг растительного материала) [14]. Активность каталазы определяли согласно методике Королюк с соавторами. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. За единицу активности каталазы принимали превращение 1 ммоль перекиси водорода за 1 с при заданных условиях, приведенное к сырой массе навески (мг растительного материала) [15].

Содержание МДА измеряли, используя метод Costa с соавторами, основанный на образовании окрашенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой при нагревании [16]. Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводили на спектрофотометре Unico 2800 (United products and Instruments, США).

Определение содержания фенольных соединений. Содержание растворимых фенольных соединений определяли по методу Фолина и Чокальтеу (Folin, Ciocalteu, 1927) в модификации Синглтона и Росси [17, 18]. 50 мг навески воздушно-сухих побегов растирали в ступке, добавляли 1.5 мл 80%-ого этанола, помещали в пробирки и выдерживали на водяной бане при 80°C в течение 30 мин. Экстракт центрифугировали 5 мин при 7500 g. К 0.5 мл супернатанта добавляли 2.5 мл реактива Фолина-Чокальтеу, приготовленного по прописи [17, 18]. Через 3 мин реакцию останавливали добавлением 2.0 мл 7.5%-ного раствора карбоната натрия. В холостую пробу вместо растительного экстракта вносили 0.5 мл этилового спирта. Пробирки с реакционной смесью встряхивали, оставляли на 2 ч, затем измеряли оптическую плотность спектрофотометром при длине волны 765 нм.

Содержание фенольных соединений в экстракте оценивали по калибровочной кривой.

Таблица 1. Влияние обработки семян бактериями на сырую массу надземной части (мг) 30-дневных растений пшеницы сорта Омская 35 при разной концентрации хлорида натрия в почве

Концентрация NaCl, г/кг почвы	Масса надземной части растения, мг		
	контроль	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 11ВМ
0	22.5 ± 0.9	26.9 ± 1.0*	33.1 ± 1.1*
3	21.1 ± 0.7	23.7 ± 0.7*	20.8 ± 0.9
4	18.4 ± 0.9	21.8 ± 0.8*	18.6 ± 0.7
5	18.0 ± 0.5	20.4 ± 0.7*	18.2 ± 0.6
6	17.0 ± 0.8	18.0 ± 0.9	17.3 ± 0.8

В качестве стандарта использовали галловую кислоту (Acros organics, Бельгия). Содержание фенольных соединений выражали в мг-экв. галловой кислоты.

Определение содержания свободного пролина. Экстракцию и определение свободного пролина проводили по модифицированной методике Шихалеевой с соавт. [19], используя кислый нингидриновый реактив, приготовленный без нагревания (навеску 1.25 г нингидрина (“Acros organics”, Бельгия) растворяли в 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл 6 М раствора H_3PO_4). Навеску свежей листовой пластины (200 мг) заливали 20 мл кипящей дистиллированной воды и выдерживали 10 мин на водяной бане при температуре 100°C. Затем в пробирку заливали 2 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл нингидринового реактива и добавляли 2 мл приготовленного экстракта. Пробы инкубировали 20 мин на водяной бане при температуре 100°C, после чего быстро охлаждали до комнатной температуры на льду. Измеряли оптическую плотность продуктов реакции при длине волны 520 нм. Содержание пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя в качестве стандарта пролин компании “Sigma” (США) [19].

Определение содержания калия и натрия в побегах растений. Содержание влаги и гигровлаги определяли по ГОСТ 57059-2016 [20]. Содержание калия и натрия определяли согласно ГОСТ 32250-2013 с помощью фотометра КФК-3 (Загорский оптико-механический завод, Россия). Макроэлементы калий и натрий определяли на пламенном фотометре ФПА (Загорский оптико-механический завод, Россия) [21].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных программ пакета Microsoft Office, данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Достоверность различий между средними

определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние соли на рост растений. При солевом стрессе происходило угнетение роста растений, как необработанных, так и обработанных бактериями (табл. 1). С увеличением концентрации соли токсический эффект усиливался. Так, у неинокулированных растений при концентрации NaCl 3, 4, 5, 6 г/кг почвы наблюдали уменьшение биомассы на 6, 18, 20 и 24.4%, соответственно, в сравнении с растениями, выросшими в почве без хлорида натрия.

При отсутствии соли в почве надземная часть растений, семена которых были инокулированы клетками бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ была больше, чем у контрольных растений на 22 и 47%, соответственно.

У растений, обработанных суспензией клеток штамма *B. subtilis* 26Д, масса надземной части при тех же концентрациях NaCl была больше на 12.3, 33, 18.4, 13.3 и 6% соответственно, в сравнении с массой необработанных растений и выросших при тех же условиях. При обработке клетками *B. subtilis* 11ВМ ростовые показатели растений при действии солевого стресса достоверно не отличались от показателей у стрессированных неинокулированных растений.

Влияние соли на активность антиоксидантных ферментов, уровень МДА, содержание фенольных соединений. Анализ активности одного из антиоксидантных ферментов, каталазы, выявил, что у растений, инокулированных клетками *B. subtilis* 26Д и 11ВМ и выросших в почве без воздействия стрессового фактора, активность изначально была выше в данном эксперименте в 2.16 и 1.75 раза, соответственно, чем у неинокулированных растений (табл. 2).

Показатели активности каталазы у неинокулированных бактериями растений, выросших при различных концентрациях NaCl, были высокими

Таблица 2. Влияние обработки семян суспензией клеток *B. subtilis* на активность каталазы и пероксидазы, содержание МДА и фенолов в надземной части пшеницы сорта Омская 35 в условиях солевого стресса

Вариант	Активность каталазы, мкат/мг сырого веса	Активность пероксидазы, опт. ед./мг сырого веса с	Содержание МДА, мкмоль/г сырого веса	Содержание фенолов, мг экв. галловой кислоты/г сухого веса
Без NaCl (0 г/кг почвы)				
Контроль	1.2 ± 0.1	10.1 ± 0.05	18.1 ± 0.3	0.15 ± 0.01
<i>B. subtilis</i> 26Д	2.6* ± 0.1	16.4* ± 0.1	18.7 ± 0.3	0.16 ± 0.01
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.1* ± 0.07	14.4* ± 0.07	18.3 ± 0.4	0.16 ± 0.01
NaCl (3 г/кг почвы)				
Контроль	2.1 ± 0.1	10.2 ± 0.3	21.9* ± 0.4	0.18 ± 0.01
<i>B. subtilis</i> 26Д	2.6* ± 0.03	17.6* ± 0.4	19.4* ± 0.4	0.19 ± 0.01
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.6* ± 0.04	14.9* ± 0.3	19.4* ± 0.5	0.19* ± 0.01
NaCl (4 г/кг почвы)				
Контроль	2.6* ± 0.1	11.3* ± 0.5	26.2* ± 0.6	0.25* ± 0.01
<i>B. subtilis</i> 26Д	2.9* ± 0.1	18.3* ± 0.3	23.2* ± 0.3	0.28* ± 0.02
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.6* ± 0.1	18.9* ± 0.2	24.2* ± 0.1	0.28* ± 0.01
NaCl (5 г/кг почвы)				
Контроль	2.2* ± 0.1	13.0* ± 0.1	34.5* ± 0.3	0.27* ± 0.02
<i>B. subtilis</i> 26Д	2.4* ± 0.1	11.6* ± 0.2	23.9* ± 0.4	0.29* ± 0.02
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.4* ± 0.09	12.9 ± 0.1	24.3* ± 0.4	0.27 ± 0.02
NaCl (6 г/кг почвы)				
Контроль	1.9* ± 0.06	15.0* ± 0.7	35.2* ± 1.0	0.20* ± 0.01
<i>B. subtilis</i> 26Д	2.3* ± 0.1	9.8* ± 0.1	24.1* ± 0.2	0.20 ± 0.01
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.1* ± 0.05	10.1* ± 0.08	25.8* ± 0.5	0.19 ± 0.01

по сравнению с контрольными растениями (выросшими в почве без соли) (табл. 2). Так, при внесении в почву NaCl в концентрации 3 г/кг почвы активность фермента увеличивалась в 1.8 раза, при 4 г/кг почвы – в 2.3 раза, при 5 г/кг – в 1.8 раза, при 6 г/кг почвы – в 1.7 раза.

При обработке семян клетками штамма *B. subtilis* 26Д активность каталазы в побегах была всегда выше в сравнении с необработанными растениями, растущими в чистой почве. Предобработка семян клетками штамма 11ВМ также приводила к увеличению активности каталазы в побегах в сравнении с контрольными растениями, однако стимуляция была менее выражена, чем при обработке *B. subtilis* 26Д.

Активность другого фермента, пероксидазы, в побегах неинокулированных бактериями растений с увеличением концентрации NaCl в почве возрастала (табл. 2). Так, при внесении в почву NaCl в концентрации 6 г/кг почвы активность фермента увеличивалась на 48.5%, по сравнению со значением у контрольных растений. У инокулированных бактериями *B. subtilis* 26Д растений,

выросших в почве с содержанием 3 г и 4 г соли в кг, отмечалось увеличение активности пероксидазы.

Предобработка семян клетками штамма 11ВМ приводила к достоверному увеличению активности пероксидазы в побегах в сравнении с контрольными растениями лишь при действии соли в концентрации 4 г/кг почвы. При дальнейшем увеличении концентрации соли активность фермента снижалась – при 6 г NaCl в кг почвы вплоть до уровня в побегах контрольных растений, растущих в чистой почве.

Содержание МДА как у инокулированных, так и неинокулированных растений при засолении почвы возрастало так, что с увеличением концентрации соли повышался и уровень МДА (табл. 2). У неинокулированных клетками бактерий обоих штаммов растений уровень МДА при концентрации NaCl 3, 4, 5, 6 г/кг почвы повышался на 20.9, 44.7, 90.6 и 94.5% (в 1.94 раза), по сравнению с контрольными растениями, выросшими в почве без содержания соли.

У инокулированных клетками бактерий растений уровень МДА был ниже, чем у неинокулиро-

Таблица 3. Влияние обработки семян суспензией клеток *B. subtilis* на содержание пролина в тканях надземной части 30-дневных растений пшеницы Омская 35 в условиях солевого стресса

Концентрация NaCl, г/кг почвы	Содержание пролина, мкмоль/г сырой массы		
	контроль	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 11ВМ
0	125.7 ± 4.5	165.0* ± 3.9	155.1* ± 1.8
3	215.0* ± 6.7	220.2* ± 1.6	255.1* ± 5.5
4	220.3* ± 3.4	215.9* ± 2.4	290.0* ± 9.0
5	322.5* ± 6.8	405.1* ± 4.2	445.8* ± 4.9
6	342.5* ± 8.8	415.9* ± 5.0	455.0* ± 9.0

Таблица 4. Изменение содержания натрия и калия (% к массе золы) в тканях надземной части пшеницы сорта Омская 35 под влиянием суспензии клеток бактерий *B. subtilis*

Концентрация NaCl, г/кг почвы	Контроль		<i>B. subtilis</i> 26Д		<i>B. subtilis</i> 11ВМ	
	К, %	Na, %	К, %	Na, %	К, %	Na, %
0	5.2 ± 0.1	0.20 ± 0.01	5.4* ± 0.1	0.20 ± 0.01	4.9* ± 0.08	0.20 ± 0.01
3	4.1 ± 0.05	1.09 ± 0.01	5.3* ± 0.1	0.77* ± 0.04	4.2 ± 0.06	0.77* ± 0.04
4	3.9* ± 0.1	1.20* ± 0.02	4.9* ± 0.1	0.88* ± 0.01	3.8 ± 0.1	1.09* ± 0.01
5	3.5* ± 0.05	2.20* ± 0.02	3.7 ± 0.07	1.44* ± 0.1	3.7 ± 0.1	1.60* ± 0.1
6	2.6* ± 0.08	2.28* ± 0.01	3.5* ± 0.07	1.64* ± 0.05	3.4* ± 0.01	2.04* ± 0.02

ванных при тех же концентрациях соли. Так, у растений, инокулированных клетками бактерий *B. subtilis* 26Д, уровень МДА при концентрациях NaCl 3, 4, 5, 6 г/кг почвы был на 11.4, 11.4, 30.7 и 31.5% ниже, соответственно, чем у неинокулированных при той же концентрации. У растений, инокулированных клетками бактерий *B. subtilis* 11ВМ, уровень МДА при концентрации NaCl 3, 4, 5, 6 г/кг почвы был на 11.4, 7.6, 29.5 и 26.7% ниже, соответственно, чем у неинокулированных при той же концентрации.

Содержание фенольных соединений с увеличением содержания NaCl повышалось как у необработанных, так и обработанных бактериями растений (табл. 2). Так, у необработанных бактериями растений при концентрации NaCl 3, 4, 5, 6 г/кг почвы уровень фенольных соединений повышался на 16, 56, 68 и 27%, соответственно. У растений, обработанных клетками бактерий обоих штаммов, содержание фенольных соединений в побегах было достоверно больше лишь при росте растений в почве, содержащей 4 г/кг соли (штаммом 26Д – на 12%, штаммом 11ВМ – 15%), а при обработке клетками штамма 26Д и при концентрации 5 г/кг почвы по сравнению с контрольными растениями, выросшими в почве без содержания соли. При концентрации NaCl 6 г/кг почвы содержание фенольных соединений в побегах было примерно равно таковому у побегов растений, растущих в почве с минимальной концентрацией соли (3 г/кг).

Влияние соли на уровень пролина. Изменение содержания пролина увеличивалось по мере возрастания интенсивности солевого стресса (табл. 3). У необработанных бактериями растений при концентрации NaCl 3 и 4 г/кг почвы содержание пролина повышалось на 71–75.3%, а при 5 г/кг и 6 г/кг – в 2.5–2.7 раза, соответственно. У обработанных клетками *B. subtilis* 26Д растений уровень пролина, так же, как и у неинокулированных, повышался, однако достоверные отличия по сравнению с необработанными и выросшими в тех же условиях, были обнаружены при концентрации соли 5 г/кг и 6 г/кг, показатели были выше в среднем 1.2 раза. У растений, инокулированных бактериями *B. subtilis* 11ВМ уровень пролина в побегах при концентрации NaCl в почве 3, 4, 5, 6 г/кг был выше на 18.6 и 31.6%, в 1.4 раза и 1.3 раза, соответственно, чем у неинокулированных при тех же условиях.

Влияние соли на содержание калия и натрия в побегах растений. Увеличение концентрации NaCl в почве приводило к повышению содержания Na⁺ и уменьшению количества ионов K⁺ в побегах растений (табл. 4). У инокулированных бактериями растений, растущих в засоленной почве, содержание ионов Na⁺ в побегах было меньше, а ионов K⁺ – больше по сравнению с неинокулированными растениями. Так, у инокулированных клетками *B. subtilis* 26Д и 11ВМ растений при концентрации NaCl 3 г/кг почвы, содержание Na⁺ в

побегах было меньше в среднем на 29.3%; при концентрации NaCl 4, 5, 6 г/кг почвы — на 26.7 и 9.2%; 34.5 и 27.3%; 28.1 и 10.5%, соответственно, в сравнении с необработанными.

Обработка семян клетками штамма 11ВМ практически не влияла на содержание калия в побегах, за исключением варианта с концентрацией соли 6 г/кг. У растений пшеницы, предварительно инокулированных бактериями *B. subtilis* 26Д, содержание калия в побегах при концентрации NaCl в почве 3, 4, 5, 6 г/кг было больше на 29.3, 25.6, 5.7, 34.6%, соответственно, чем у неинокулированных.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие соли в почве вызывает значительные изменения физиологических и морфологических показателей растений [4, 7]. Засоление ведет к развитию осмотического стресса, во время которого растения сталкиваются с компромиссом между получением воды и риском обезвоживания клеток, что в конечном итоге подавляет рост и деление клеток [4]. В наших экспериментах подавление роста под действием соли наблюдалось как у необработанных растений, так и у обработанных бактериями *B. subtilis*. Более высокие показатели роста в условиях засоления у растений, инокулированных бактериями, по сравнению с неинокулированными, были отмечены только в отношении *B. subtilis* 26Д, хотя оба штамма проявляли ростостимулирующий эффект на незасоленной почве. Известно, что оба исследованных штамма продуцируют различные биологически активные вещества, в том числе и фитогормоны, способны улучшать минеральное питание растений, защищать от патогенов, стимулировать рост корней и побегов, повышая тем самым стрессоустойчивость растений [22, 23]. Повышенный рост инокулированных растений в контролируемой и стрессовой среде, скорее всего, связан с синтезом ИУК PGPB [4].

Наряду с осмотическим стрессом еще одним негативным эффектом засоления является генерация АФК, вызывающих окислительный стресс. Накопление АФК в цитоплазме растительных клеток увеличивает риск повреждения мембран клеток и органелл, снижает стабильность белков и нуклеиновых кислот. В растениях в ответ на стрессовый фактор активируются различные системы антиоксидантной защиты, в которых участвуют такие ферменты, как пероксидаза, каталаза и др [24, 25].

У растений, инокулированных бактериями, наблюдались повышенные активности каталазы и пероксидазы (особенно у штамма 26Д), вследствие чего такие растения испытывали меньший стресс в условиях засоления. Оба фермента, как известно, участвуют в удалении перекиси водоро-

да, что уменьшает силу негативного ее влияния на рост растений через различные механизмы [1, 2].

Уровень малонового диальдегида у обработанных бактериями растений был ниже, чем у неинокулированных. Повышенное накопление МДА при солевом стрессе может быть связано с повреждением мембран солью [3, 4]. Бактеризация семян, таким образом, может способствовать, вероятно, сохранению целостности мембранных структур растительных клеток пшеницы.

Известно, что в условиях солевого стресса метаболизм модифицируется и осмопротекторы (например, пролин) накапливаются для поддержания ионного баланса в клетке [30]. Было обнаружено, что индуцированное солевым стрессом накопление пролина было значительно выше у инокулированных бактериями растений. Проллин, как известно, улучшает способность клеток удерживать воду, участвует в регулировании осмотического давления и обладает другими защитными функциями, не нарушая нормальный обмен веществ. Считается, что осмотически активные вещества помогают растениям противостоять экстремальному осмотическому стрессу на протяжении всего жизненного цикла растения, защищают белки и другие клеточные мембраны от различных стрессовых воздействий [7]. Исследования показали, что под влиянием клеток штамма 11ВМ при выращивании растений в условиях солевого стресса пролина накапливалось больше в надземной части пшеницы, чем под влиянием штамма 26Д. Егоршиной было показано, что обработка семян пшеницы клетками бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ приводит к увеличению содержания АБК в побегах растений, что и могло привести к увеличению уровня синтеза пролина, так как известно, что АБК участвует в регуляции синтеза пролина [23].

Фенольные соединения играют жизненно важную роль в устойчивости растений к абиотическим стрессам, как, например, антиоксиданты в виде сложных эфиров, флавоноидов и других веществ, а также способствуя балансу минеральных компонентов в некоторых растительных органах [20, 26].

В большинстве случаев хлорид натрия является основным солевым токсикантом, и его негативный эффект может наблюдаться в виде снижения продуктивности или гибели растений. Засоление почвы вызывает у растений осмотический и токсический стрессы. Устойчивость растительных организмов к таким неблагоприятным факторам, наряду с другими механизмами, связана, в том числе с уменьшением количества ионов Na^+ , поступающих в растение и оттока ионов K^+ [1, 6, 9]. Установлено, что обработка растений бактериями в условиях засоления снижало поступление Na^+ в побеги. Аналогичные результаты были получены при использовании в экспериментах и

других видов бактерий [7]. Известно, что стимулирующие рост растений ризобактерии (PGPR) модулируют архитектуру корней, расширяя ризосферу, уменьшая долю негативно действующих ионов и помогая, тем самым, растению поддерживать ионное равновесие [24]. Известно, что бактерии *B. subtilis*, синтезируют гормоны и разнообразные органические кислоты. Спектр кислот, синтезируемых *B. subtilis* 11BM, более разнообразен, и бактерии этого штамма синтезируют их значительно больше, чем *B. subtilis* 26Д [23]. Наличие органических кислот, продуцируемых бактериями *B. subtilis* 11BM в ризосфере, может увеличивать степень диссоциации ионов, в том числе Na^+ , что наряду с некоторыми негативными процессами, например, усилением перекисного окисления липидов, косвенным свидетельством которому является накопление МДА, большее, чем при действии бактерий *B. subtilis* 26Д, могло повышать уровень ионов натрия, поступающих в растения, которые конкурировали с ионами калия, чем и может быть объяснен более низкий уровень содержания этого иона в побегах растений, инокулированных клетками штамма 11BM.

Таким образом, исследованные эндофитные штаммы *B. subtilis* 26Д и 11BM обладают хорошим потенциалом для адаптации растений к солевому стрессу, однако протекторный эффект у штамма 26Д выражен лучше, чем у 11BM. Исследованные эндофиты повышают активность антиоксидантных ферментов, снижают уровень МДА как продукта перекисного окисления липидов; повышают уровень фенольных соединений и пролина; уменьшают количество поступающих в ткани ионов натрия и могут быть применены для повышения устойчивости растений к солевому стрессу.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ji C., Tian H., Wang X., Song X., Ju R., Li H., Gao Q., Li C., Zhang P., Li J., Hao L., Wang C., Zhou Y., Xu R., Liu Y. et al. *Bacillus subtilis* HG-15, a halotolerant rhizoplane bacterium, promotes growth and salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) // BioMed Research International. 2022. V. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9506227>
2. Gamalero E., Bona E., Todeschini V., Lingua G. Saline and arid soils: impact on bacteria, plants, and their interaction // Biology. 2020. V. 9: 116. <https://doi.org/10.3390/biology9060116>
3. Polash M.A., Sakil M.A., Hossain M.A. Plants responses and their physiological and biochemical defense mechanisms against salinity: A review // Trop. Plant Res. 2019. V. 6. P. 250.
4. Fortt J., González M., Morales P., Araya N., Remonsellez F., Coba de la Peña T., Ostria-Gallardo E., Stoll A. Bacterial modulation of the plant ethylene signaling pathway improves tolerance to salt stress in lettuce (*Lactuca sativa* L.) // Front. Sustain. Food Syst. 2022. V. 6: 768250. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.768250>
5. Ren C.-G., Kong C.-C., Liu Z.-Y., Zhong Z.-H., Yang J.-C., Wang X.-L., Qin S. A perspective on developing a plant 'holobiont' for future saline agriculture // Front. Microbiol. 2022. V. 13: 763014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.763014>
6. Gao Y., Zou H., Wang B., Yuan F. Progress and applications of plant growth-promoting bacteria in salt tolerance of crops // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23: 7036. <https://doi.org/10.3390/ijms23137036>
7. Krishnamoorthy R., Roy Choudhury A., Walitang D.I., Anandham R., Senthilkumar M., Sa T. Salt stress tolerance-promoting proteins and metabolites under plant-bacteria-salt stress tripartite interactions // Appl. Sci. 2022. V. 12: 3126. <https://doi.org/10.3390/app12063126>
8. Gupta A., Mishra R., Rai S., Bano A., Pathak N., Fujita M., Kumar M., Hasanuzzaman M. Mechanistic insights of plant growth promoting bacteria mediated drought and salt stress tolerance in plants for sustainable agriculture // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23: 3741. <https://doi.org/10.3390/ijms2307374>
9. Kumar A., Singh S., Gaurav A.K., Srivastava S., Verma J.P. Plant growth-promoting bacteria: biological tools for the mitigation of salinity stress in plants // Front. Microbiol. 2020. V. 11: 1216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216>
10. Hameed A., Ahmed M.Z., Hussain T., Aziz I., Ahmad N., Gul B., Nielsen B.L. Effects of salinity stress on chloroplast structure and function // Cells. 2021. V. 10: 2023. <https://doi.org/10.3390/cells10082023>
11. Ahmad R., Anjum M.A., Khalid M.F., Saqib M., Hassan A. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in plants under salt stress // Plant Abiotic Stress Tolerance / Eds. Hasanuzzaman M. et al. Springer, Cham. 2019. P. 475. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_8
12. Pal K.K., Dey R., Sherathia D.N., Devidayal Mangalassery S., Kumar A., Rupapara R.B., Mandalaya M., Rawal P., Bhadania R.A., Thomas M., Patel M.B., Maida P., Nawade B.D., Ahmad S., Dash P., Radhakrishnan T. Alleviation of salinity stress in peanut by application of endophytic bacteria // Front. Microbiol. 2021. V. 12: 650771. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.650771>
13. Bezrukova M.V., Lubyanova A.R., Fatkhutdinova R.A. The involvement of wheat and common bean lectins in the control of cell division in the root apical meristems of various plant species // Russian Journal of Plant Physiology. 2011. V. 58. P. 174.
14. Khairullin R.M., Yarullina L.G., Troshina N.B., Akhmetova I.E. Chitoooligosaccharide-induced activation of o-phenylenediamine oxidation by wheat seedlings in the presence of oxalic acid // Biochemistry (Moscow). 2001. V. 66. P. 286.
15. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16.

16. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // Plant Sci. 2002. V. 162. P. 939.
17. Folin O., Ciocalteu O. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins // J. Biol. Chem. 1927. V. 73. P. 627.
18. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolyb-dicphoungstic acid reagent // Am. J. Enol. Vitic. 1965. V. 16. P. 144.
19. Шихалеева Г.Н., Будняк А.К., Шихалеев И.И., Иващенко О.Л. Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2014. Вип. 21. С. 168.
20. ГОСТ 57059-2016. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. экспресс метод определения влаги. Москва: Стандартинформ, 2020. 6 с. <https://internet-law.ru/gosts/gost/62895/>
21. ГОСТ 32250-2013 (ISO 7485:2000). Корма, комбикорма. Метод определения содержания калия и натрия с применением пламенно-эмиссионной спектрометрии. Москва: Стандартинформ, 2020. 13 с.
22. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Соhс в агроэкосистемах. Москва: Наука, 2007. 147 с.
23. Egorshina A.A., Luk'yantsev M.A., Khairullin R.M., Sakhabutdinova A.R. Involvement of phytohormones in the development of interaction between wheat seedlings and endophytic *Bacillus subtilis* strain 11BM // Russian Journal of Plant Physiology. 2012. V. 59. P. 134.
24. Fatima A., Hussain S., Hussain S., Ali B., Ashraf U., Zulfikar U., Aslam Z., Al-Robai S.A., Alzahrani F.O., Hano C., El-Esawi M.A. Differential morphophysiological, biochemical, and molecular responses of maize hybrids to salinity and alkalinity stresses // Agron. 2021. V. 11: 1150. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061150>
25. Khan I., Muhammad A., Chattha M.U., Skalicky M., Bilal Chattha M., Ahsin Ayub M., Rizwan Anwar M., Soufan W., Hassan M.U., Rahman M.A., Brestic M., Zivcak M., El Sabagh A. Mitigation of salinity-induced oxidative damage, growth, and yield reduction in fine rice by sugarcane press mud application // Front. Plant Sci. 2022. V. 13: 840900. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.840900>
26. Santander C., Vidal G., Ruiz A., Vidal C., Cornejo P. Salinity eustress increases the biosynthesis and accumulation of phenolic compounds that improve the functional and antioxidant quality of red lettuce // Agronomy. 2022. V. 12: 598. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030598>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И АЗОТНОГО ГОЛОДАНИЯ НА МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДВУХ ШТАММОВ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *Lobosphaera* sp. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)

© 2023 г. К. А. Шибзухова^a, *, О. Б. Чивкунова^a, Е. С. Лобакова^a

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: shibzuhovaKA@my.msu.ru

Поступила в редакцию 19.12.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Впервые изучено одновременное воздействие азотного голодания и температурного шока на физиологию и ультраструктуру клеток двух штаммов микроводорослей рода *Lobosphaera* — NAMSU 924/2 и NAMSU (CALU) 1497. Дефицит азота у обоих штаммов приводил к снижению содержания хлорофилла в 3 раза и увеличению доли каротиноидов в 2 раза. При температуре +10°C наблюдалось снижение содержания как хлорофилла, так и каротиноидов. Одновременное воздействие двух факторов проявлялось в снижении содержания хлорофилла в 3 раза у NAMSU 924/2, и в 6 раз — у NAMSU (CALU) 1497, доля каротиноидов у обоих штаммов уменьшалась в 1.5–2 раза. Получены данные по ультраструктурным изменениям клеток микроводорослей рода *Lobosphaera* при воздействии стрессовых факторов. Отмечен сходный характер ответа у обоих штаммов на стрессовые условия. Дефицит азота приводил к накоплению в цитоплазме клеток вдоль клеточной стенки многочисленных липидных глобул. Длительная инкубация на безазотной среде приводила к заполнению всего объема клеток липидными глобулами, разборке мембранной системы хлоропластов, их уменьшению в размерах, располагаясь между плотно лежащими липидными глобулами. При низкой температуре уменьшалось число тилакоидов, увеличивались межтилакоидное пространство и размеры хлоропластов. При одновременном воздействии азотного голодания и низкой температуры накапливались многочисленные липидные глобулы, уменьшалось число тилакоидов, увеличивались межтилакоидное пространство и размер хлоропластов, отмеченные при отдельном воздействии стрессовых факторов. Пиреноид у обоих штаммов во всех случаях не претерпевал существенных изменений.

Ключевые слова: *Lobosphaera*, азотное голодание, жирные кислоты, микроводоросли, низкие температуры, пигменты, стрессовые факторы, ультраструктура, физиология

DOI: 10.31857/S0015330322600772, EDN: IBUSDD

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли (МВ) в стрессовых условиях характеризуются способностью к накоплению в значительных количествах ценных для человека метаболитов — белков, углеводов, полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), минералов, витаминов, антиоксидантов и микоспорин-подобных аминокислот [1–3]. К стрессовым факторам, как правило, относятся свет высокой интенсивности, дефицит элементов минерального питания, а также осмотический и температурный шок. Синтез и накопление в клетках метаболитов представляют собой адаптивный ответ на воздействие неблагоприятных условий [4–7]. Интерес к таким МВ обусловлен возможностью их использования для производства пищевых добавок, красите-

лей, антиоксидантов, ПНЖК, токсинов, удобрений и мн. др. [8–10].

Почвенные зеленые МВ рода *Lobosphaera* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) характеризуются высокой адаптационной пластичностью. В процессе адаптации к стрессовым условиям МВ накапливают длинноцепочечную ω-6-полиненасыщенную арахидоновую жирную кислоту (С20:4), а также в меньших количествах эйкозапентаеновую (ЭПК, С20:5) и докозагексаеновую (ДГК, С22:6) кислоты. Рядом исследователей отмечено накопление ПНЖК в рекордных количествах, что позволяет рассматривать данные МВ как природные растительные источники отмеченных ПНЖК. В то же время отмечено, что содержание жирных кислот (ЖК) варьируется как среди видов внутри рода, так и среди изолятов и штаммов одного вида [11, 12].

На сегодняшний день ведется поиск условий культивирования для увеличения содержания ПНЖК в клетках МВ, а также штаммов МВ, характеризующихся максимальным содержанием ЖК, и как следствие, для повышения выхода целевого продукта.

Предлагаемая статья посвящена сравнительной характеристике морфологических и физиологических особенностей двух коллекционных штаммов *Lobosphaera* sp., продуцентов ценных для человека ПНЖК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Для исследований были выбраны штаммы МВ *Lobosphaera* sp. NAMSU 924/2 и NAMSU (CALU) 1497. В исходных образцах было отмечено появление колоний с разной морфологией, которые были пересеяны в отдельные чашки и велась как отдельные линии. Полученные штаммы альгологически чистых культур были депонированы в "Коллекцию биотехнологически значимых микроводорослей Национального банка-депозитария живых систем "Ноев Ковчег" (NAMSU)" с присвоением соответствующих идентификационных номеров.

Условия культивирования

Культивирование штаммов МВ проводили в конических колбах Эрленмейера при температуре +23°C, постоянном освещении белым светом 40 мкмоль квантов ФАР м⁻² с⁻¹ на модифицированной минеральной среде BG-11 [13] с добавлением KNO₃ (BG-11_K): NaNO₃ — 1.5 г/л; KNO₃ — 1.78 г/л; K₂HPO₄ — 0.04 г/л; MgSO₄·7H₂O — 0.075 г/л; CaCl₂·2H₂O — 0.036 г/л; лимонная кислота — 0.006 г/л; FeNH₄-citr — 0.006 г/л; Na₂EDTA — 0.001 г/л; Na₂CO₃ — 0.02 г/л. Раствор микроэлементов (1 мл/л): H₃BO₃ — 1.43 г/500 мл; MnCl₂·4H₂O — 0.905 г/500 мл; ZnSO₄·7H₂O — 0.11 г/500 мл; Na₂MoO₄·2H₂O — 0.195 г/500 мл; CuSO₄·5H₂O — 0.0395 г/500 мл; Co(NO₃)₂·6H₂O — 0.0247 г/500 мл.

Стрессовые условия (дефицит азота в среде культивирования, низкие температуры) моделировали путем культивирования МВ на минеральной среде BG-11_K без добавления азота и при снижении температуры до +10°C.

Методы исследования

Изучение морфологии, описание жизненного цикла и оценку состояния культур МВ проводили с применением методов светопольной микроскопии при использовании светового микроскопа Leica DM-2500 LED (Leica, Германия), оснащенного фотокамерой DFC-7000T (Leica, Германия).

Изучение микроморфологии поверхности клеточной стенки проводили с применением сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL Ltd., Япония) с ускоряющим напряжением 15 кВ Межкафедральной Лаборатории Электронной Микроскопии биологического факультета Центра коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова. Биомассу клеток фиксировали в 2% глутаровом альдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4) с последующим обезвоживанием в градиенте этанола, высушиванием и напылением образцов, согласно методике Gorelova et al. [14].

Исследование ультраструктурных особенностей клеток штаммов проводили с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL Ltd., Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и цифровой фотокамерой ORIUS SC1000W (Gatan, США) в Межкафедральной Лаборатории Электронной Микроскопии биологического факультета Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова. Биомассу клеток фиксировали в 2% глутаровом альдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4) с последующей дофиксацией в 1% растворе OsO₄ [14]. Для дальнейшей заливки была использована смесь эпоксидной смолы Araldite (Sigma-Aldrich, Германия). Серийные ультратонкие срезы были получены на ультрамикротоме LKB-4800 (Broma, Швеция), которые дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу [15].

Определение профиля жирных кислот суммарных липидов биомассы микроводорослей

Для оценки профиля жирных кислот (ЖК) суммарных липидов был применен метод газожидкостной хроматографии с использованием газового хроматографа Agilent 7890A (Agilent Technologies, США), оборудованного 30-метровой капиллярной колонкой HP-5MS UI (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) (Agilent, США) и соединенного с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 5975C (Agilent Technologies, США). В качестве газа-носителя использовался гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Экстракция липидов проводилась по методу Фолча [14, 16]. В качестве внутреннего стандарта была выбрана маргаритовая кислота (C17:0). Для идентификации ЖК был использован набор стандартов (Sigma, США). Относительное содержание ЖК определяли в весовых процентах от суммарного содержания в пробе. Коэффициент ненасыщенности ЖК определяли как описано ранее [17] и рассчитывали по формуле:

$$K = \Sigma UFA / \Sigma SFA,$$

где K — коэффициент ненасыщенности, ΣUFA — суммарное содержание ненасыщенных жирных

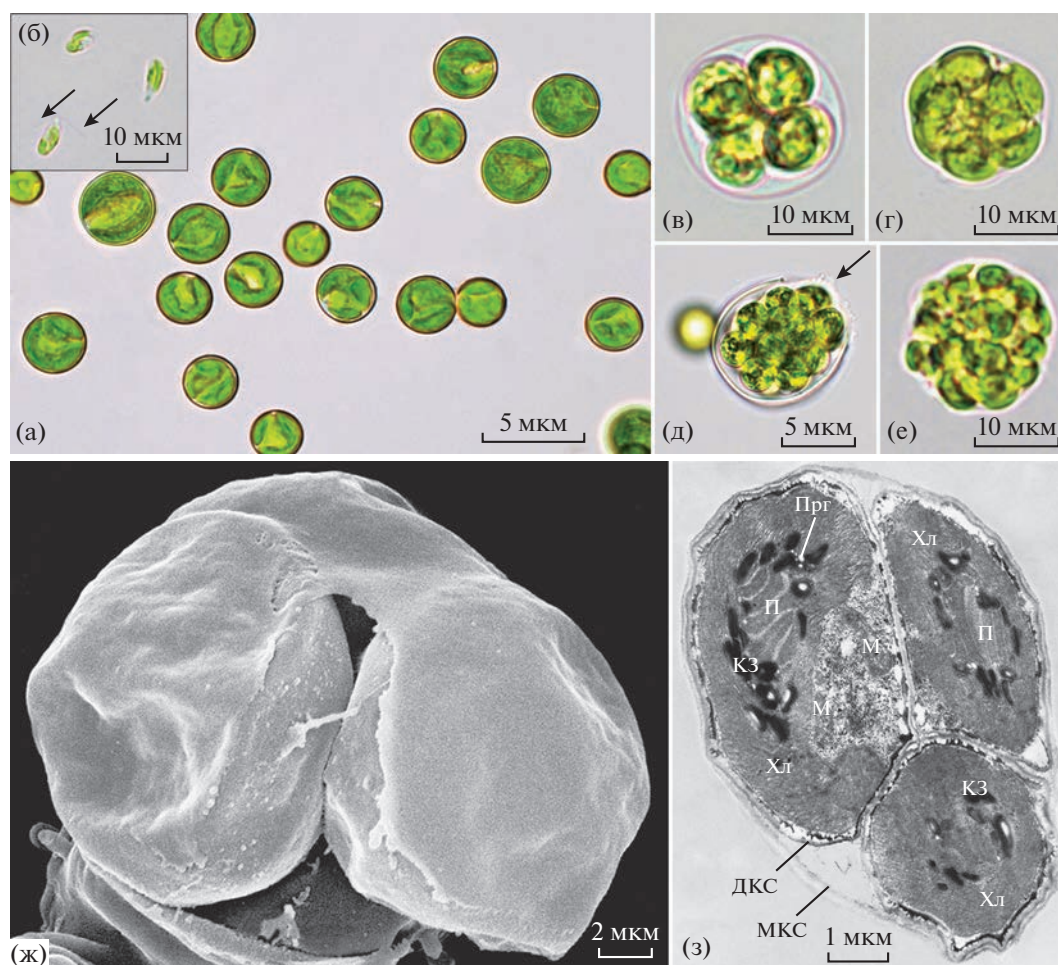


Рис. 1. Жизненные стадии исследованных МВ (микрографии СвМ): (а) – вегетативные клетки на примере NAMSU 924/2, (б) – зооспоры с двумя жгутиками (указаны стрелками) на примере NAMSU 924/2, (в) – автоспорангий с автоспорами на примере NAMSU (CALU) 1497, (г) – зооспорангий с зооспорами на примере NAMSU 924/2, (д) – высвобождение автоспор на примере NAMSU (CALU) 1497, (е) – апланоспорангий с апланоспорами на примере NAMSU (CALU) 1497. Ультраструктурная организация спорангиев изученных штаммов МВ: (ж) – автоспорангий на примере штамма NAMSU (CALU) 1497 (микрография СЭМ), (з) – автоспорангий на примере NAMSU (CALU) 1497 (микрография ТЭМ). ДКС – клеточная стенка дочерних клеток, КЗ – крахмальные зерна, М – митохондрия, МКС – клеточная стенка материнской клетки-спорангия, П – пиреноид, Прг – пиреноглобулы, Хл – хлоропласт.

кислот (вес. %), ΣSFA – суммарное содержание насыщенных жирных кислот (вес. %) в пробе.

В ходе экстракции ЖК был также проведен анализ содержания пигментов с применением спектрофотометрического метода. Расчет пигментов в хлороформной фракции проводили согласно Wellburn [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На всех стадиях роста в культурах *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 доминирующей жизненной формой являлись неподвижные одиночные сферические вегетативные клетки, диаметр клеток достигал 4–20 мкм у *Lobosphaera* sp. 924/2 и 7–20 мкм у *Lobosphaera* sp. 1497 (рис. 1а). В жизненном цикле штаммов были отмечены подвиж-

ные зооспоры грушевидной, яйцевидной и шаровидной формы с двумя изоконтными жгутиками на апикальном конце клетки, достигающими в длину 10 мкм (рис. 1б). Половое размножение не было отмечено. Помимо зооспор присутствовали вегетативные клетки, автоспорангии с 4–8 автоспорами и апланоспорангии с 32–64 апланоспорами (рис. 1в, е). Высвобождение автоспор и апланоспор происходило путем разрыва материнской оболочки спорангия (рис. 1г).

В культурах *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 методом сканирующей электронной микроскопии были обнаружены клетки с двумя типами клеточной поверхности – войлочной и гладкой. Для первой было характерно наличие фибрилл до 50 нм толщиной, которые переплетаясь формировали так называемый “войлоч-

Таблица 1. Состав жирных кислот суммарных липидов штаммов MB *Lobosphaera* sp. NAMSU 924/2 и *Lobosphaera* sp. NAMSU (CALU) 1497

ЖК, вес. %	NAMSU 924/2	NAMSU (CALU) 1497
C16:0	18.4	18.4
C18:0	4.5	1.9
C18:1 Δ^9	7.4	19.5
C18:1 Δ^{11}	5.4	7.6
C18:2 $\Delta^{9,12}$	7.9	15.5
C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	8.4	7.6
C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$	0.5	5.3
C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	24.1	18.9
C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	8.8	2.5

Примечание. Приведены преобладающие жирные кислоты, содержание которых превышало 4.5 вес. % хотя бы в одном из изученных штаммов, по истечении 7 сут. культивирования при +23°C и постоянном освещении.

ный” слой [19], для второй — гладкая, без выростов и фибрилл (рис. 1ж, 2а).

По результатам исследований ультратонких срезов (ТЭМ) клеточная стенка обоих штаммов микроводорослей состояла из двух слоев. К внешнему осмифильному слою клеточной стенки прикреплялись тонкие разветвленные переплетенные гликопротеиновые фибриллы. Внешний слой клеточной стенки обладал кистевидной структурой с многочисленными канал-образными участками низкой электронной плотности и достигал в толщину 20–40 нм у штамма *Lobosphaera* sp. 924/2 и 40–70 нм у *Lobosphaera* sp. 1497. Внутренний слой клеточной стенки характеризовался низкой электронной плотностью и толщиной 40–190 нм у *Lobosphaera* sp. 924/2 и 100–150 нм у *Lobosphaera* sp. 1497 (рис. 2б).

Пластидом вегетативных клеток штаммов был представлен одним крупным париетальным чашевидным двухмембранным хлоропластом с двумя долями, занимающим большую часть объема клетки (рис. 2в). Тилакоиды в строме собраны в протяженные граны. В строме хлоропласта выявлялся один пиреноид диаметром 1–3 мкм, пронизанный параллельными интрапиреноидными тилакоидами (рис. 2г). Вокруг пиреноида между интрапиреноидными тилакоидами располагались крахмальные зерна, образуя фрагментированную крахмальную обкладку (рис. 2г). Кроме того, крахмал откладывался в виде одиночных стромальных зерен между стромальными ламеллами. Вокруг пиреноида располагались отдельные пиреноглобулы, связанные с тилакоидными мембранами пиреноидного матрикса (рис. 2г). Хондриом вегетативных клеток обоих штаммов микроводорослей был представлен митохондриями с пластинчатыми кристами (рис. 2в). Клетки обоих штаммов содержали одно округлое или эллиптическое (на поперечном срезе) ядро с одним ядрышком (рис. 2в).

В цитоплазме клеток были рассеяны единичные мелкие вакуоли, в которых встречались электронно-плотные включения. По периферии вдоль клеточной стенки были отмечены мелкие одиночные, иногда сливающиеся крупные липидные глобулы (рис. 2б).

Изученные штаммы MB характеризовались, типичным для отдела Chlorophyta, пигментным составом [20–22]. На основании спектров поглощения экстрактов биомассы, были выявлены максимумы хлорофиллов *Хл а* (666 нм и 433 нм) и *б* (плечо около 650 нм), а также плечо в диапазоне 460–490 нм, присущие каротиноидам (рис. 3).

Исследованные штаммы характеризовались способностью к синтезу в значительных количествах кислоты-биомаркера — ω -6-полиненасыщенной арахидоновой кислоты (C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$). Ее содержание достигало 23–25 вес. % у *Lobosphaera* sp. 924/2 и 15–18 вес. % у штамма *Lobosphaera* sp. 1497 (табл. 1).

Особенности воздействия стрессовых условий на микроводоросли

Изменения пигментного состава клеток

При культивировании клеток штамма *Lobosphaera* sp. 924/2 на безазотной среде при температуре +23°C отмечалось значительное (в 3 раза) снижение содержания в клетках хлорофилла (*Хл*) (рис. 4а), увеличение доли каротиноидов (*Кар*) — в 2 раза (рис. 4б), при этом соотношение каротиноидов к хлорофиллу (*Кар/Хл*) увеличивалось в 1.5 раза (рис. 4в). Культивирование при температуре +10°C на полной среде приводило к снижению содержания как *Хл*, так и *Кар* (в 2 раза). При одновременном воздействии дефицита азота и снижения температуры на клетки микроводорослей количество *Хл* в биомассе снижалось в

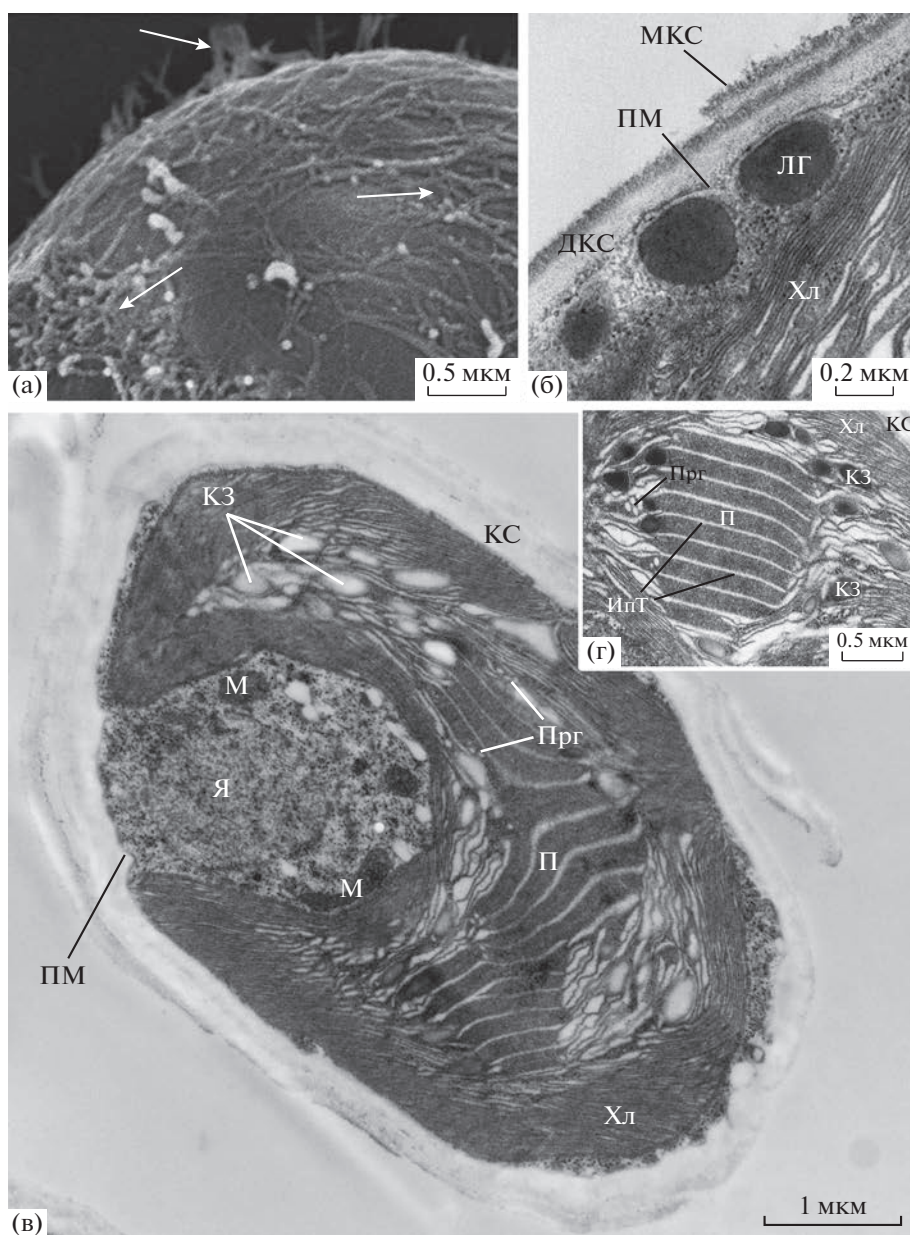


Рис. 2. Особенности ультраструктурной организации клеток исследованных штаммов МВ: (а) — фрагмент клеточной стенки с поверхностными структурами в виде гликопротеиновых филаментов (указаны стрелками) на примере NAMSU 924/2 (микрография СЭМ), (б) — фрагмент клеточной стенки на примере 924/2 (микрография ТЭМ), (в) — общий вид вегетативной клетки на примере NAMSU (CALU) 1497 (микрография ТЭМ), (г) — фрагмент пиреноида с интрапиреноидными тилакоидами (микрография ТЭМ). ДКС — клеточная стенка дочерних клеток, ИнТ — интрапиреноидные тилакоиды, КЗ — крахмальные зерна, КС — клеточная стенка, ЛГ — липидная глобула, М — митохондрия, МКС — клеточная стенка материнской клетки-спорангия, П — пиреноид, Прг — пиреноглобулы, Хл — хлоропласт, ПМ — плазматическая мембрана, Я — ядро.

3 раза, *Kap* и соотношение *Kap*/*Хл* — в 1.5–2 раза (рис. 4б, в).

При дефиците азота в среде культивирования в клетках штамма *Lobosphaera* sp. 1497 содержание *Хл* снижалось в 6 раз (рис. 4а), *Kap* — в 2 раза (рис. 4б), а соотношение *Kap*/*Хл* увеличивалось в 3 раза. При пониженной температуре инкубации наблюдалось снижение содержания *Хл* в 2 раза, а содер-

жание *Kap* также — в 1.5–2 раза (рис. 4а, б). В тоже время воздействие комплекса стрессовых факторов приводило к существенному снижению доли *Хл* — в 6 раз, а *Kap* — в 3 раза, соотношение *Kap*/*Хл* увеличивалось в 3 раза (рис. 4).

Культивирование *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 в условиях дефицита азота приводило к значительному увеличению содержания

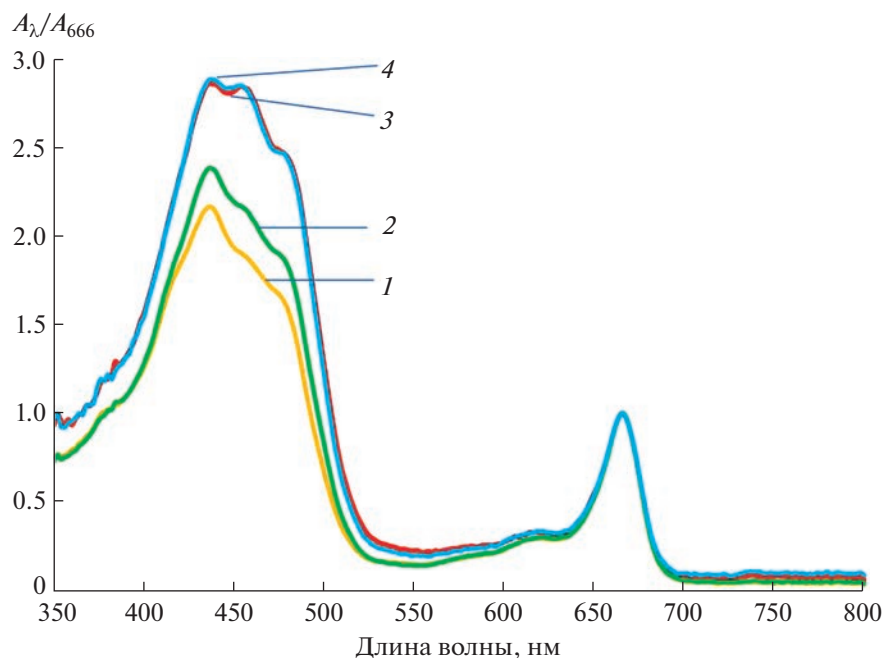


Рис. 3. Спектры поглощения (нормированные на 666 нм) пигментов клеток на примере *Lobosphaera* sp. NAMSU 924/2 при культивировании: (1) на полной среде при +23°C, (2) при снижении температуры до +10°C, (3) на безазотной среде при +23°C и (4) на безазотной среде при +10°C.

арахидоновой кислоты, тогда как выращивание при температуре +10°C не приводило к существенным изменениям ее содержания. Культивирование в условиях одновременного воздействия двух факторов (дефицита азота и низкой температуры +10°C) приводило к большему накоплению маркерной кислоты ω-6-полиненасыщенной арахидоновой кислоты (C20:4Δ^{5,8,11,14}) в суммарной фракции липидов клеток до 35 вес. %.

Морфологические изменения клеток микроводорослей при воздействии стрессовых факторов

В ходе инкубации микроводорослей на безазотной среде клетки штаммов *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 меняли окраску на светло-желтую, а при воздействии низкой температуры изменение окраски их клеток не происходило. Однако при температуре +10°C у обоих штаммов наблюдалось массовое формирование зооспорангиев и зооспор с двумя изоконтными жгутиками.

Ультраструктурные изменения клеток обоих штаммов микроводорослей при инкубации в условиях дефицита азота в среде имели сходный характер. В течение первых 14 сут. не отмечено изменение формы и размеров хлоропласта. Однако выявлено накопление вокруг пиреноида пиреноглобул, в строме хлоропластов — многочисленных пластоглобул и крахмальных зерен. В цитоплазме клеток отмечено накопление вдоль клеточной стенки

многочисленных липидных глобул разной формы и размеров (рис. 5а).

Длительная инкубация (более 14 сут.) на безазотной среде приводила к постепенному заполнению всего объема клеток липидными глобулами (рис. 5б). При этом в результате разборки большей части мембранной системы, хлоропласты уменьшались в размерах, располагаясь между плотно лежащими липидными глобулами (рис. 5б). Пиреноид у штаммов в условиях дефицита азота не претерпевал существенных изменений. Даже при длительной инкубации клеток на безазотной среде четко выявлялась ультраструктура пиреноида с многочисленными интрапиреноидными тилакоидами, фрагментированной крахмальной обкладкой и пиреноглобулами.

Инкубация при низкой температуре приводила к значительным изменениям в структуре хлоропластов: отмечено уменьшение числа тилакоидов в гранах в результате разборки мембранной системы, увеличение межтилакоидного пространства, и, как следствие, увеличение размеров хлоропластов (рис. 5в, г). При этом клеточная стенка и пиреноид, как и в случае инкубации микроводорослей в условиях дефицита азота, не претерпевали структурных изменений (рис. 5в, г).

В ходе инкубации микроводорослей *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 на безазотной среде при низкой температуре отмечались ультраструктурные изменения пластидома и накопление липидных глобул. В клетках выявлялись

многочисленные разнообразные по форме и размеру, иногда сливающиеся крупные липидные глобулы, занимающие большую площадь среза клетки (рис. 5д). Как и в случае действия низкой температуры, в хлоропластах отмечено уменьшение числа тилакоидов, увеличение межтилакоидного пространства (рис. 5д). Пиреноид не претерпевал ультраструктурных изменений (рис. 5д).

ОБСУЖДЕНИЕ

Интерес к МВ обусловлен их уникальным составом и высоким потенциалом в качестве природных источников-продуцентов для пищевой, фармацевтической, химической, косметической промышленности и сельского хозяйства [2, 3, 23].

Липиды некоторых штаммов МВ особенно богаты ценными для человека ПНЖК такими, как линолевая (C18:2), α -линоленовая (C18:3), арахидоновая (C20:4), эйкозапентаеновая (C20:5) и докозагексаеновая (C22:6) [24].

Исследованные штаммы МВ рода *Lobosphaera* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) характеризуются способностью к синтезу в значительных количествах кислоты-биомаркера — ω -6-полиненасыщенной арахидоновой кислоты. Однако качественный и количественный состав ПНЖК является штамм-специфичным, а также зависит от условий культивирования. Накопление ПНЖК рассматривается как адаптивный ответ и защитная реакция клеток МВ на воздействие стрессовых факторов. В оптимальных для роста условиях МВ характеризуются активным ростом числа клеток, синтезом мембранных и хлоропластных липидов. Тогда как, в стрессовых условиях наступает, так называемая липогенная фаза, сопровождающаяся редукцией фотосинтетического аппарата, разборкой мембранных систем хлоропластов, снижением скорости деления клеток, а в некоторых случаях остановкой клеточных делений. Как следствие, в клетках увеличивается содержание ЖК, накапливаются триацилглицериды и неполярные липиды, а также каротиноиды [4, 25–28]. Синтезированные *de novo* ПНЖК откладываются в виде липидных глобул в цитоплазме. Кроме того, отмечаются случаи формирования глобул, так называемых пластоглобул, между тилакоидами хлоропластов [4, 29].

Стрессовые условия культивирования МВ существенно влияют на ультраструктуру клеток. При этом воздействие стрессовых факторов по отдельности и совместно является штамм-специфичным. Ранее было показано, что при инкубации клеток *Parietochloris incisa* (*Lobosphaera incisa*) в условиях дефицита азота наблюдается уменьшение размеров хлоропласта и накопление липидных глобул в цитоплазме [30]. В проведенных нами исследованиях для штаммов *Lobosphaera* sp. NAMSU 924/2 и *Lobosphaera* sp. NAMSU (CALU) 1497 были пока-

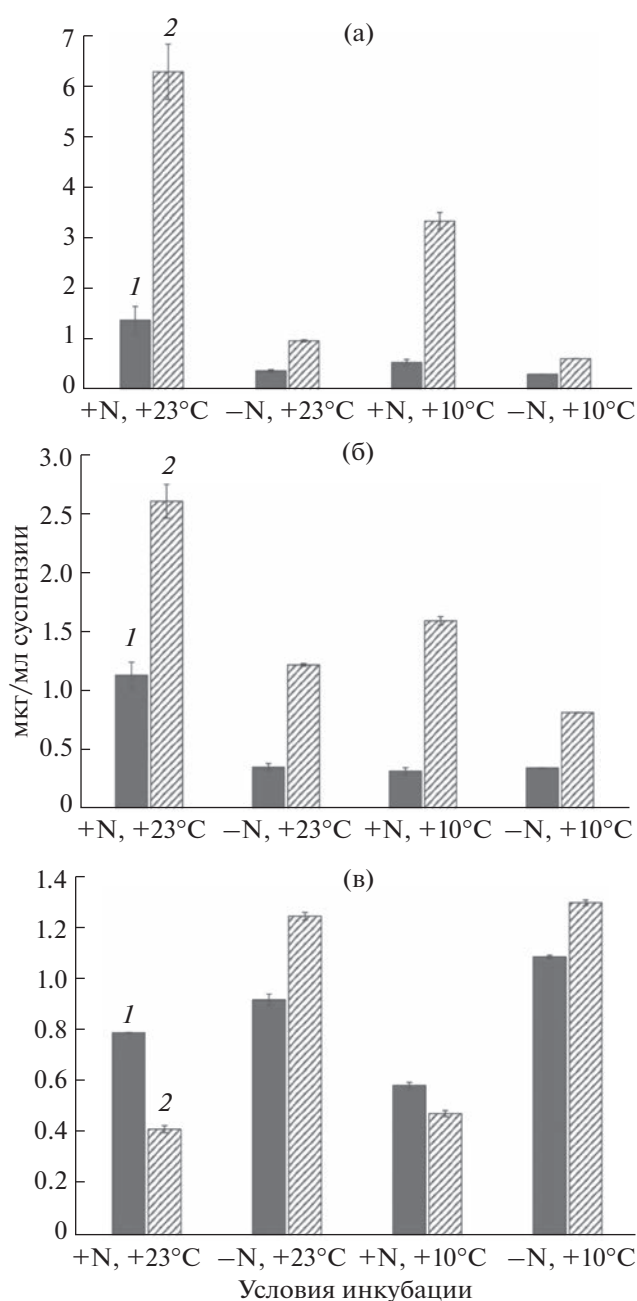


Рис. 4. Динамика изменения содержания (а) хлорофилла, (б) каротиноидов и (в) соотношения каротиноидов к хлорофиллу в клетках исследованных штаммов (1) NAMSU 924/2 и (2) NAMSU (CALU) 1497 при воздействии стрессовых факторов.

заны сходные ультраструктурные изменения при дефиците азота. Тогда как при низкой температуре отмечалась редукция мембранных систем хлоропластов, увеличивалось межтилакоидное пространство, что приводило к “набуханию” хлоропласта, что проявлялось в увеличении размеров хлоропласта. Это также соответствует изменениям морфологии клеток. В частности, при инкуба-

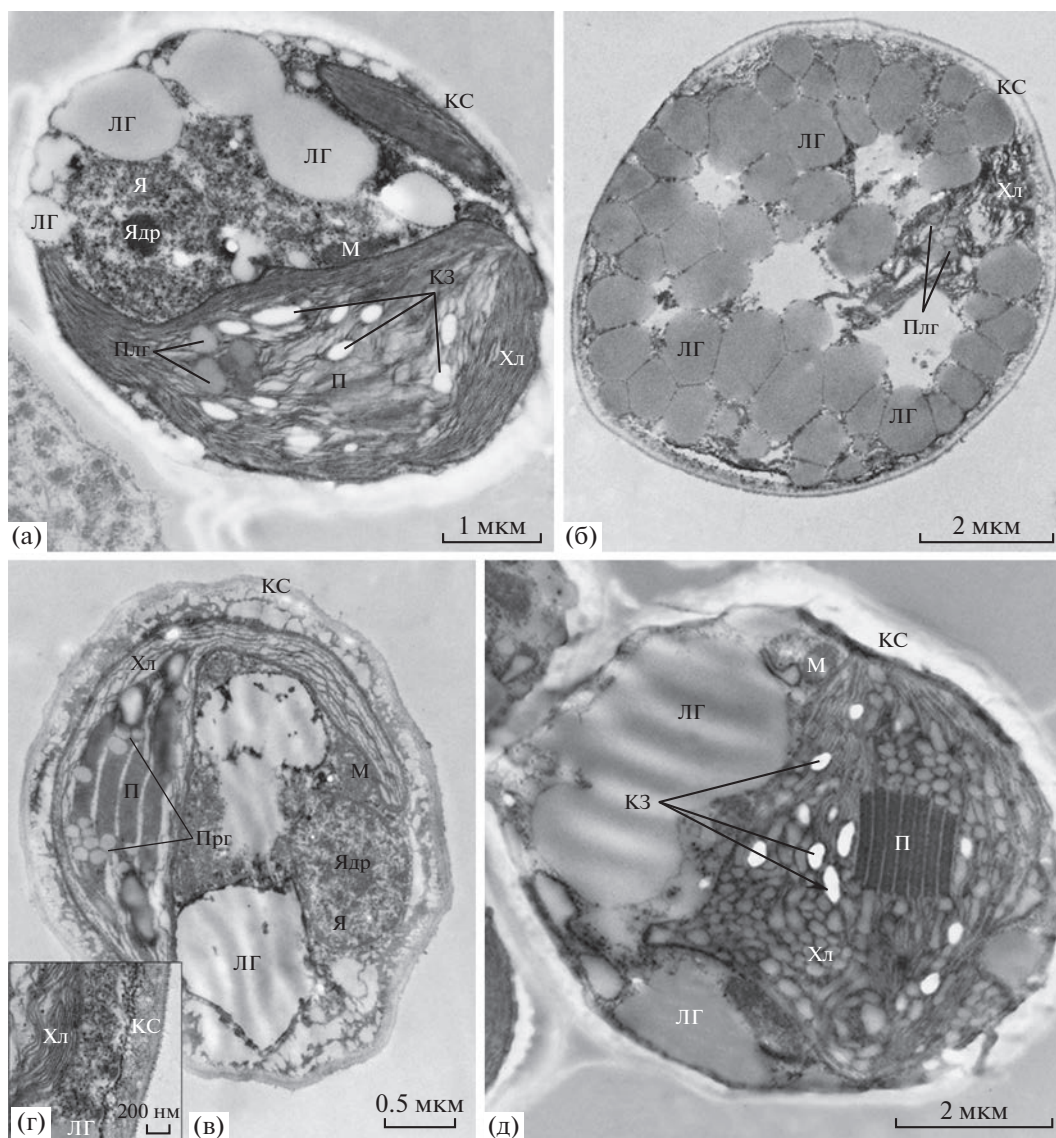


Рис. 5. Особенности ультраструктурной организации клеток штаммов при воздействии стрессовых факторов (микрo-
 графии ТЭМ): (а) общий вид вегетативной клетки при инкубации на безазотной среде BG-11_к и температуре +23°C
 на примере NAMSU (CALU) 1497; (б) общий вид вегетативной клетки при длительной (более 14 сут.) инкубации на
 безазотной среде BG-11_к и температуре +23°C на примере NAMSU 924/2; (в) общий вид вегетативной клетки на
 примере NAMSU (CALU) 1497 и (г) фрагмент клеточной стенки на примере NAMSU 924/2 при снижении температуры до +10°C;
 (д) общий вид вегетативной клетки при инкубации на безазотной среде BG-11_к и температуре +10°C. КЗ — крахмаль-
 ные зерна, КС — клеточная стенка, ЛГ — липидная глобула, М — митохондрия, П — пиреноид, Прг — пиреноглобулы,
 Плг — пластоглобулы, Хл — хлоропласт, ПМ — плазматическая мембрана, Я — ядро, Ядр — ядрышко.

ции в условиях дефицита азота клетки меняли окраску, что связано было со снижением содержания хлорофилла и увеличение доли каротиноидов в клетках.

Для *Parietochloris incisa* (*Lobosphaera incisa*) исследовано влияние азотного голодания и света высокой интенсивности на состав пигментов, ЖК и ультраструктуру [30–32]. Тогда как, данные по воздействию низких температур и сочетанного воздействия низких температур и азотного голо-

дания на МВ рода *Lobosphaera* в доступной литературе отсутствуют.

Исследование новых штаммов рода *Lobosphaera* показало гетерогенность штаммов как по морфологическим, так и физиологическим признакам. Одновременно в популяции исследованных штаммов были отмечены клетки разных стадий жизненного цикла. По всей видимости, многообразие морфотипов зооспор (от грушевидных до сферических) связано с наличием их переходных форм в ходе развития до вегетативных клеток [33].

Различия в структуре клеточной поверхности также связаны со стадиями жизненного цикла. Отмечено, что клеточная стенка “молодых” клеток (размером 3–6 мкм) отличалась наличием войлочного слоя, тогда как “зрелые” клетки (размером 20–30 мкм) имели гладкую поверхность. В тоже время поверхность автоспорангиев и апланоспорангиев была гладкой и лишенной фибрилл и бородавок. Тогда как для всех дочерних клеток (спор), в том числе и не освобожденных, были отмечены поверхностные структуры. При этом, ультраструктура клеток МВ обоих штаммов имела типичное строение для представителей рода *Lobosphaera* [30, 34].

Ультраструктурные и физиологические изменения клеток МВ *Parietochloris incisa* (*Lobosphaera incisa*) в условиях стресса (азотного голодания и высокой интенсивности света) было описано ранее [30]. Однако влияние низких температур на физиологию и ультраструктуру клеток МВ данного рода ранее не описывалось.

Отмеченные нами ультраструктурные изменения при инкубации в условиях азота соответствуют ранее описанным для *Lobosphaera incisa* (*Parietochloris*) [30, 35]. Характер ультраструктурных изменений при воздействии низких температур отличался от таковых при влиянии азотного голодания, что проявлялось в существенных изменениях в структуре хлоропластов: разборка тилакоидов, увеличение межтилакоидного пространства и, как следствие, наблюдалось “губчатое набухание” хлоропластов. Отмеченные морфологические и ультраструктурные изменения были характерны не только для свободных клеток, но и для дочерних еще не освободившихся клеток, находящихся в авто- и апланоспорангиях.

Отмеченные ультраструктурные изменения согласуются с данными по изменению содержанию пигментов и их соотношению, а также накоплением жирных кислот, в частности к большему накоплению маркерной кислоты ω -6-полиненасыщенной арахидоновой кислоты ($C_{20:4\Delta^{5,8,11,14}}$) в суммарной фракции липидов клеток до 35 вес. %.

Ценность ПНЖК, как и в целом МВ-продуктов ПНЖК, неуклонно растет. Основные исследования в данной области направлены на изучение особенностей синтеза и накопления ЖК клетками МВ, влияния стрессовых факторов на синтез ПНЖК, а также поиск и подбор условий культивирования для повышения выхода целевого продукта – ЖК.

Исследованные штаммы представляют интерес для биотехнологии в качестве экологически чистого сырья жирных кислот, в особенности арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот. Полученные результаты показывают, что оптимизация условий культивирова-

ния может влиять на накопление целевых продуктов – ПНЖК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20–74–10028 и в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология”.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borowitzka M.A. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints // J. Appl. Phycol. 1997. V. 9. P. 393. <https://doi.org/10.1023/A:1007921728300>
2. Michalak I., Chojnacka K. Algal extracts: technology and advances // Eng. Life Sci. 2014. V. 14. P. 581. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400139>
3. Chojnacka K., Wieczorek P., Schroeder G., Michalak I. Algae biomass: characteristics and applications: towards algae-based products // Springer. 2018. V. 8. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74703-3>
4. Соловченко А.Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 192.
5. Guschina I.A., Harwood J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae // Prog. Lipid Res. 2006. V. 45. P. 160. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>
6. Morgan-Kiss R.M., Priscu J., Pocock T., Gudynaite-Savitch L., Norman P.A. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. V. 70. P. 222. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006>
7. Cohen Z., Khozin-Goldberg I., Adlerstein D., Bigogno C. The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae // Biochem. Soc. Trans. 2000. V. 28. P. 740. <https://doi.org/10.1042/bst0280740>
8. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. and Isambert A. Commercial applications of microalgae // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 101. P. 87. <https://doi.org/10.1042/bst0280740>
9. Ibañez E., Cifuentes A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients // J. Sci. Food Agric. 2013. V. 93. P. 703. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6023>
10. Ścieszka S., Klewicka E. Algae in food: A general review // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2019. V. 59. P. 3538. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>
11. Mudimu O., Koopmann I.K., Rybalka N., Friedl T., Schulz R., Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on

- α -tocopherol production // J. Appl. Phycol. 2017. V. 29. P. 2867.
https://doi.org/10.1007/s10811-017-1188-1
12. Мальцев Е.И., Мальцева И.А., Мальцева С.Ю., Куликовский М.С. Биотехнологический потенциал нового штамма *Bracteacoccus bullatus* (Sphaeropleales, Chlorophyta), перспективного продуцента омега-6 полиненасыщенных жирных кислот // Физиология растений. 2020. Т. 67. С. 96.
https://doi.org/10.31857/S0015330320010121
 13. Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // Bacteriolog. Rev. 1971. V. 35. P. 171.
https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971
 14. Gorelova O.A., Baulina O.I., Solovchenko A.E., Chekanov K.A., Chivkunova O.B., Fedorenko T.A., Lobakova E.S. Similarity and diversity of the *Desmodesmus* spp. microalgae isolated from associations with White Sea invertebrates // Protoplasma. 2015. V. 252. P. 489.
https://doi.org/10.1007/s00709-014-0694-0
 15. Reynolds E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque strain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. P. 208.
https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208
 16. Folch J., Lees M., Stanley G.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497.
https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5
 17. Kates M. Lipid extraction procedures. In Burden, R.H. and van Knippenberg, P.H. [Eds.] Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. 2nd edn. Elsevier Science, Amsterdam. 1986. P. 106.
 18. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Physiol. 1994. V. 144. P. 307.
https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2
 19. Steward F.C., Mühlethaler K. The structure and development of the cell-wall in the *Valoniaceae* as revealed by the electron microscope // Ann. Bot. 1953. V. 17. P. 295.
https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083351
 20. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Meth. Enzym. 1987. V. 148. P. 350.
https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1
 21. Cunningham Jr.F.X., Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 1998. V. 49. P. 557.
https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.557
 22. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions // Marine drugs. 2011. V. 9. P. 1101.
https://doi.org/10.3390/md9061101
 23. Borowitzka M. Algal biotechnology products and processes — matching science and economics // J. Appl. Phycol. 1992. V. 4. P. 267.
https://doi.org/10.1007/BF02161212
 24. Bigogno C., Khozin-Goldberg I., Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid // Phytochem. 2002. V. 60. P. 497.
https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00100-0
 25. Leman J. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential // Adv. Appl. Microbiol. 1997. V. 43. P. 195.
https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70226-0
 26. Goodson C.R.R., Wang Z.T., Goodenough U. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost // Eukaryotic cell. 2011. V. 10. P. 1592.
https://doi.org/10.1128/EC.05242-11
 27. Fan J., Andre C., Xu C. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii* // FEBS Letters. 2011. V. 585. P. 1985.
https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018
 28. Schüller L.M., Schulze P.S., Pereira H., Barreira L., León R., Varela J. Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae // Algal Res. 2017. V. 25. P. 263.
https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.025
 29. Kugler A., Zorin B., Didi-Cohen S., Sibiryak M., Gorelova O., Ismagulova T., Kokabi K., Kumari P., Lukyanov A., Boussiba S., Solovchenko A., Khozin-Goldberg I. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the green microalga *Lobosphaera incisa* contribute to tolerance to abiotic stresses // Plant Cell Physiol. 2019. V. 60. P. 1205.
https://doi.org/10.1093/pcp/pcz013
 30. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Gorelova O.A., Reshetnikova I.V., Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Cohen Z. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxio-phyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2007. V. 43. P. 833.
https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00375.x
 31. Соловченко А.Е., Хозина-Голдберг И., Диди-Коэн Ш., Коэн Ц., Мерзляк М.Н. Влияние света и азотного голодания на содержание и состав каротиноидов зеленой водоросли *Parietochloris incisa* // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 507.
 32. Соловченко А.Е., Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Решетникова И.В., Хозина-Голдберг И., Диди-Коэн Ш., Коэн Ц. Влияние освещенности и азотного голодания на рост и накопление арахидоновой кислоты у одноклеточной водоросли *Parietochloris incisa* // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2008b. № 1. С. 49.
 33. Темралеева А.Д. Новые для почвенной альгофлоры России виды зеленых водорослей *Bracteacoccus bullatus* и *B. occidentalis* (Sphaeropleales, Chlorophyta) // Вопросы современной альгологии. 2018. № 1. С. 14.
 34. Watanabe S., Hirabayashi S., Boussiba S., Cohen Z., Vonshak A., Richmond A. *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxio-phyceae, Chlorophyta) // Phycolog. Res. 1996. V. 44. P. 107.
https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1996.tb00383.x
 35. Khozin-Goldberg I., Shrestha P., Cohen Z. Mobilization of arachidonoyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa* // BBA — Mol. Cell Biol. Lipids. 2005. V. 1738. P. 63.
https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.09.005

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ФОТОПЕРИОДА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.)

© 2023 г. В. Н. Попов^а, *, А. Н. Дерябин^а

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

*e-mail: vnporov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2022 г.

После доработки 07.12.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Исследовали влияние продолжительности фотопериода на эффективность низкотемпературного закаливания растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экотип Col-0. Закаливание 6-недельных растений проводили при температуре 2°C в течение 1–5 сут., используя фотопериоды 0, 8 и 16 ч (освещенность 200 мкмоль/(м² с)). Показано, что растения, подвергнутые закаливанию в темноте, не были устойчивы к морозу, согласно данным по выживаемости и выходу электролитов после тестирующего промораживания (–6°C, 1 сут.). Растения, закаленные на свету (независимо от фотопериода), к концу периода закаливания значительно повысили свою морозоустойчивость. Отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание у этих растений было почти в два раза выше, чем в контроле (без закаливания). Вариант с 16-часовым фотопериодом превосходил вариант с 8-часовым освещением, как по максимальным уровням накопления сахаров (почти на 40%), так и по скорости достижения этих уровней в посуточной динамике закаливания. Показано транзиторное увеличение содержания МДА в первые сутки закаливания на свету и отсутствие изменений в содержании МДА при закаливании в темноте, что может свидетельствовать о сигнальной функции продуктов перекисного окисления липидов при закаливании. Установлено влияние продолжительности фотопериода на скорость формирования устойчивости растений *A. thaliana* к морозу. Более длительная работа фотосинтетического аппарата *A. thaliana* при 16 ч фотопериоде значительно повышала скорость накопления сахаров при закаливании и, соответственно, скорость формирования устойчивости к морозу по сравнению с 8 ч фотопериодом. Заключено, что для быстрого формирования повышенной устойчивости *A. thaliana* к морозу требуется сочетание низкой положительной температуры и 16-часового фотопериода.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, низкотемпературное закаливание, перекисное окисление липидов, сахара, фотопериод, фотосинтез

DOI: 10.31857/S0015330322600619, EDN: IASUAI

ВВЕДЕНИЕ

Среди абиотических стрессоров низкая температура является одним из важнейших экологических факторов, ограничивающих продуктивность и географическое распространение растений [1]. В контексте глобального изменения климата частота неблагоприятных погодных явлений, таких как низкие положительные и отрицательные температуры, возрастает, что серьезно ограничивает сельскохозяйственное производство [2]. Чтобы противостоять повреждающему действию отрицательных температур, растения умеренного климата обладают способностью повышать свою морозоустойчи-

вость в ответ на действие низких положительных температур. Этот процесс известен как низкотемпературное закаливание (cold hardening/cold acclimation) [3]. Закаливание затрагивает практически все физиологические и биохимические процессы растений, а также вызывает значительные изменения в экспрессии генов, отвечающих за синтез белков, участвующих в формировании устойчивости к морозу [4, 5]. Установлено, что для каждого вида растений существуют соответствующие генотипу условия закаливания, которые включают такие параметры как температура окружающей среды, длина дня, интенсивность освещения и продолжительность закаливания.

В природных условиях низкотемпературное закаливание происходит осенью при низких положительных температурах и обеспечивает сезон-

Сокращения: МДА – малоновый диальдегид, ПОЛ – перекисное окисление липидов, ЭТЦ – электрон-транспортная цепь.

ное выживание озимых и многолетних растений при отрицательных температурах в зимний период. Закаливание часто связывают с уменьшением фотопериода, что инициирует прекращение роста растений и создает условия для его эффективного прохождения. Для древесных растений уменьшение длины дня в осенний период является обязательным условием для формирования повышенной устойчивости к морозу [6, 7]. Роль фотопериода в закаливании травянистых растений не столь очевидна. Так, в работе Wanner и Junttila было показано, что наименьший прирост устойчивости к морозу у *A. thaliana* наблюдался при закаливании (2°C) на коротких световых периодах (3 и 6 ч), тогда как максимальная морозоустойчивость формировалась при использовании более длительных световых периодов (12 и 16 ч) [8]. Согласно другим авторам, морозоустойчивость растений *A. thaliana* в условиях короткого дня (8 ч) была выше, чем в условиях длинного дня (16 ч) [9].

Широко известна работа Труновой [10] по исследованию влияния светового режима при закаливании на морозостойкость озимой пшеницы. В этой работе было показано, что устойчивость к морозу озимой пшеницы можно повысить как на коротком, так и на непрерывном дне. При круглосуточном освещении высокая морозостойкость достигалась после первой недели закаливания, а на коротком световом дне (8 ч) аналогичная устойчивость развивалась к концу третьей недели закаливания.

В связи с этим цель нашей работы заключалась в исследовании влияния продолжительности фотопериода при низкотемпературном закаливании на посуточную динамику формирования морозоустойчивости растений, уделяя внимание не только фотосинтетической, но и сигнальной роли света в этом процессе. Для этого мы использовали вид *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Col-0), который является общепризнанным модельным организмом для изучения молекулярных и физиологических механизмов, лежащих в основе адаптации растений к низким температурам [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объектами исследования являлись растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экотип Col-0. Растения выращивали в вазонах с почвой в камерах фитотрона ИФР РАН при следующих условиях: температура 22°C, 8-часовой фотопериод и освещенность 200 мкмоль/(м² с). Выбор 8-часового режима светового дня для *A. thaliana* обусловлен тем, что он относится к длиннодневным растениям и при использовании короткого дня достигает необходимой для исследований биомассы розетки, не переходя в фазу цветения. Для опытов использовали растения в возрасте 6 недель. Закаливание растений проводили в

климатической камере KBW-240 (“Binder”, Германия) при температуре 2°C. Во время закаливания применялись различные режимы освещения растений: без освещения (фотопериод 0 ч), освещение 8 ч при 200 мкмоль/(м² с) (фотопериод 8 ч), освещение 16 ч при 200 мкмоль/(м² с) (фотопериод 16 ч). Длительность закаливания варьировала от 1 до 5 сут. В качестве контроля использовали растения, не подвергнутые воздействию закаливающих процедур.

Определение устойчивости растений к низкой температуре. Устойчивость растений *A. thaliana* к низкой температуре оценивали с помощью метода прямого промораживания. Для этого незакаленные и закаленные в течение 1–5 сут. растения переносили на 1 сут. в климатическую камеру MIR-153 (“Sanyo”, Япония) с температурой –6°C. Данный режим промораживания, подобранный в ходе предварительных опытов, приводит к гибели всех незакаленных растений *A. thaliana* и позволяет достоверно оценивать эффективность закаливания. После промораживания растения переносили в оптимальные для вегетации условия на одну неделю. Выживаемость рассчитывали, как число выживших растений в % от общего количества растений подвергнутых промораживанию.

Степень морозоустойчивости незакаленных и закаленных растений *A. thaliana* также оценивали по выходу электролитов из листовой ткани в водную фазу. Электропроводность водных экстрактов определяли при помощи кондуктометра SG7-ELK (“Mettler Toledo”, Швейцария). Выход электролитов из тканей листьев (*V*, в %) рассчитывали по формуле:

$$V = 100 \times (L_o / L_k),$$

где L_o – электропроводность исследуемого образца до или после низкотемпературной экспозиции и L_k – электропроводность того же образца после кипячения [12].

CO₂-газообмен растений. Определение параметров CO₂-газообмена растений *A. thaliana* проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (“Hartmann & Braun”, Германия) при 22°C (контроль) и 2°C (закаленные растения), т. е. при температурах, идентичных температурам вегетации и холодового закаливания. Измерения газообмена включали определение скорости видимой ассимиляции CO₂ и темнового дыхания, которые выражали в мг CO₂/г сухой массы ч. На основе этих параметров рассчитывали отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание [13].

Определение содержания сахаров. Навески листьев *A. thaliana* (~500 мг) фиксировали 96% кипящим этанолом. Далее ткань гомогенизировали и сахара извлекали трехкратной экстракцией 80% этанолом. В полученных экстрактах определяли

содержание глюкозы — глюкозооксидазным методом, сахарозы и фруктозы — по методу Рое [14]. Полученные результаты выражали в мг/г сухой массы.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА). Об интенсивности процессов ПОЛ судили по накоплению одного из продуктов окисления — МДА. Содержание МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Навеску листьев (300 мг) гомогенизировали в 5 мл среды выделения (0.1 М трисHCl буфер, pH 7.6, содержащий 0.35 М NaCl). К 3 мл гомогената добавляли 2 мл 0.5% тиобарбитуровой кислоты в 20% трихлоруксусной кислоте, инкубировали при 95°C в течение 30 мин., охлаждали, фильтровали и регистрировали оптическую плотность при длине волны 532 нм. В качестве контроля использовали среду выделения с реагентом. Содержание малонового диальдегида рассчитывали в мкмоль/г сухой массы [15].

Статистическая обработка данных. Во всех экспериментах биологическая повторность измерений была 10-кратной, аналитическая 3–4-кратной. Каждый эксперимент повторяли не менее 3 раз. Результаты экспериментов обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На гистограммах и в таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями оценена по *t*-критерию Стьюдента для 95% уровня значимости ($P < 0.05$). Достоверно различающиеся между собой величины обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблицах 1 и 2 представлены результаты экспериментов по изучению влияния продолжительности фотопериода (0, 8 и 16 ч) во время низкотемпературного закаливания на выживаемость растений *A. thaliana* и проницаемость их клеточных мембран после суточного тестирующего промораживания при температуре -6°C . Из полученных данных по выживаемости (табл. 1) видно, что после промораживания контрольные растения (без закаливания) и все растения, прошедшие закаливание в отсутствие света, погибли. Число растений, выживших после промораживания, возрастало с увеличением продолжительности фотопериода, начиная с первых суток закаливания. Однако при использовании 16-часового фотопериода выживаемость растений после тестирующего промораживания на протяжении всего периода закаливания была 100%, тогда как при 8-часовом фотопериоде этот показатель был максимальным только после 3 сут. закаливания (табл. 1).

После промораживания растений *A. thaliana* выход электролитов, являющийся показателем степени целостности клеточных мембран, зави-

Таблица 1. Влияние продолжительности фотопериода при закаливании на выживаемость растений *A. thaliana* после промораживания при температуре -6°C в течение 1 сут.

Длительность закаливания, сут.	Выживаемость, %		
	продолжительность фотопериода, ч		
	0	8	16
Без закаливания	0 ^d	0 ^d	0 ^d
1	0 ^d	25 ± 4 ^c	100 ^a
2	0 ^d	65 ± 7 ^b	100 ^a
3	0 ^d	100 ^a	100 ^a
4	0 ^d	100 ^a	100 ^a
5	0 ^d	100 ^a	100 ^a

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

Таблица 2. Влияние продолжительности фотопериода при закаливании на выход электролитов из листьев растений *A. thaliana* после промораживания при температуре -6°C в течение 1 сут.

Длительность закаливания, сут.	Выход электролитов, %		
	продолжительность фотопериода, ч		
	0	8	16
Без закаливания	91 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a
1	90 ± 5 ^a	54 ± 4 ^b	40 ± 3 ^c
2	88 ± 5 ^a	45 ± 3 ^{bc}	27 ± 3 ^d
3	91 ± 5 ^a	32 ± 3 ^d	25 ± 2 ^d
4	83 ± 4 ^a	26 ± 4 ^d	26 ± 4 ^d
5	82 ± 5 ^a	24 ± 3 ^d	25 ± 3 ^d

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

сел от продолжительности фотопериода и длительности закаливания (табл. 2). У контрольных растений (без закаливания), а также у растений, закаленных без освещения (независимо от длительности закаливания), выход электролитов был очень высоким и варьировал от 82 до 91%, что свидетельствовало о необратимых нарушениях в структуре и функциях мембран и гибели клеток листьев. Наличие в период низкотемпературного закаливания света способствовало резкому снижению величины выхода электролитов после промораживания растений, что указывало на сохранение структурно-функционального состояния клеточных мембран.

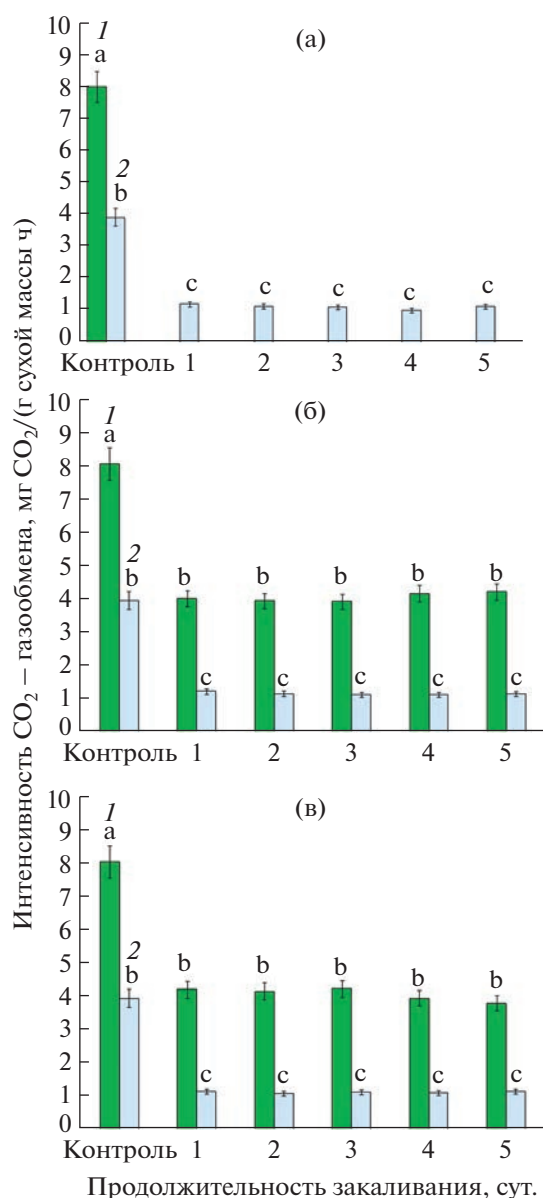


Рис. 1. Изменение параметров CO_2 -газообмена растений *A. thaliana* при закаливании в условиях фотопериодов различной продолжительности: (а) – 0 ч, (б) – 8 ч, (в) – 16 ч. 1 – видимый фотосинтез; 2 – темновое дыхание. Достоверные различия средних значений при $P < 0.05$ отмечены разными латинскими буквами над барами.

Так, у растений после 1 сут. закаливания на 8- и 16-часовом фотопериоде и последующего тестирующего промораживания выход электролитов из тканей листьев существенно снижился, по сравнению с растениями, не подвергавшимися закаливанию (контроль). В дальнейшем, при обоих вариантах фотопериода с увеличением длительности закаливания величина выхода электролитов продолжала снижаться и после 5 сут. составляла 24–25% (табл. 2).

Одним из интегральных физиологических показателей растений, реагирующих на изменение температуры, является CO_2 -газообмен. В период низкотемпературного закаливания при различной продолжительности фотопериода у растений *A. thaliana* были определены параметры CO_2 -газообмена, такие как, видимый фотосинтез и темновое дыхание, а также рассчитано отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание. Результаты показали, что при закаливании растений интенсивность темнового дыхания снижалась почти в три раза, независимо от продолжительности фотопериода (рис. 1). На протяжении всего периода закаливания в темноте видимый фотосинтез у растений не регистрировался (рис. 1а). При 8- и 16-часовом фотопериоде интенсивность видимого фотосинтеза снизилась примерно в два раза, по сравнению с контролем (без закаливания), но оставалась значительно выше, чем интенсивность темнового дыхания (рис. 1б, в). Отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание у растений при закаливании на 8- и 16-часовом фотопериоде было почти в два раза выше, чем в контроле.

Продолжительность фотопериода при низкотемпературном закаливании растений *A. thaliana* оказало существенное влияние на содержание сахаров (фруктозы, глюкозы, сахарозы) в листьях. Из данных, представленных на рис. 2 видно, что при отсутствии освещения в период закаливания содержание каждой из этих форм сахаров в листьях не претерпевало достоверных изменений, оставаясь на уровне контроля (без закаливания). Наличие 8- и 16-часового фотопериода приводило к резкому накоплению сахаров, преимущественно, в форме глюкозы, особенно в первые трое суток закаливания, в дальнейшем уровень всех форм сахаров выходил на плато. По сравнению с контролем, на 5 сут. закаливания растений при 8- и 16-часовом фотопериоде содержание фруктозы в листьях увеличилось в 19.1 и 21.3 раз, глюкозы – в 10.5 и 15.6 раз, сахарозы – в 2.0 и 2.5 раз, соответственно. Суммарное содержание сахаров в листьях за период низкотемпературного закаливания растений при 16-часовом фотопериоде было больше на 10 мг/г сухой массы, по сравнению с 8-часовым. При этом накопление сахаров происходило более интенсивно при использовании 16-часового фотопериода, чем 8-часового.

На протяжении всего периода закаливания растений в темноте содержание МДА – одного из конечных продуктов ПОЛ, не изменялось (рис. 3). Наличие 8- и 16-часового фотопериода способствовало накоплению МДА в листьях, но только в 1 сут. закаливания. В дальнейшем содержание МДА в обоих вариантах было на уровне контроля (без закаливания).

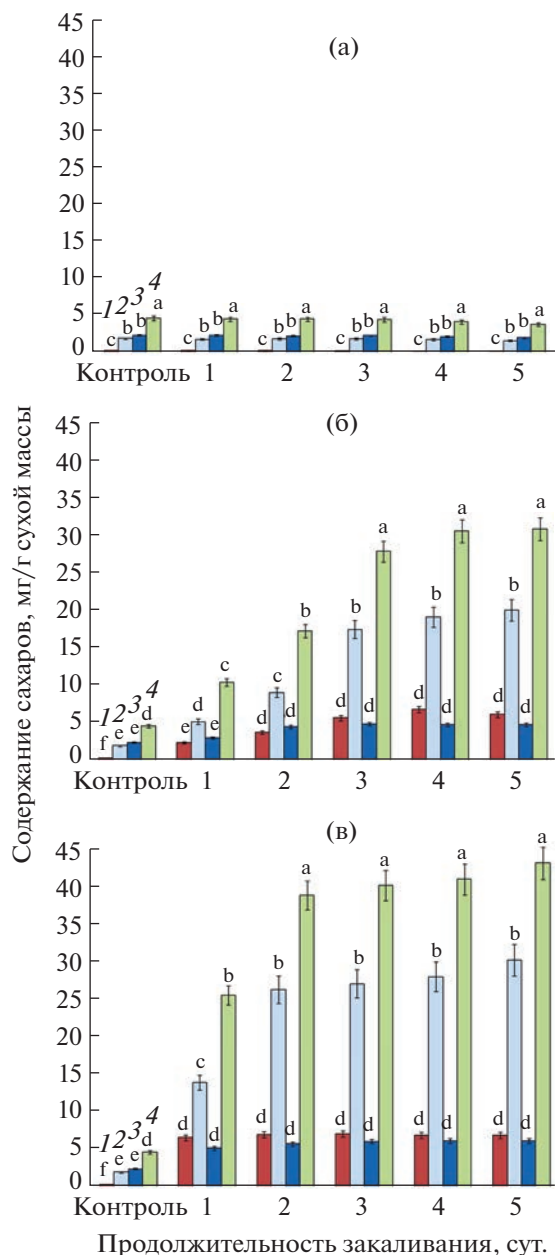


Рис. 2. Изменение содержания сахаров в листьях *A. thaliana* при закаливании растений в условиях фотопериодов различной продолжительности: (а) – 0 ч, (б) – 8 ч, (в) – 16 ч. 1 – фруктоза; 2 – глюкоза; 3 – сахароза; 4 – сумма сахаров. Достоверные различия средних значений при $P < 0.05$ отмечены разными латинскими буквами над барами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Закаливание необходимо для формирования повышенной устойчивости растений к морозу, позволяющей выдерживать более низкие отрицательные температуры по сравнению с незакаленными растениями [11]. Для оценки эффективности процесса закаливания наиболее часто используются метод прямого промораживания целых растений

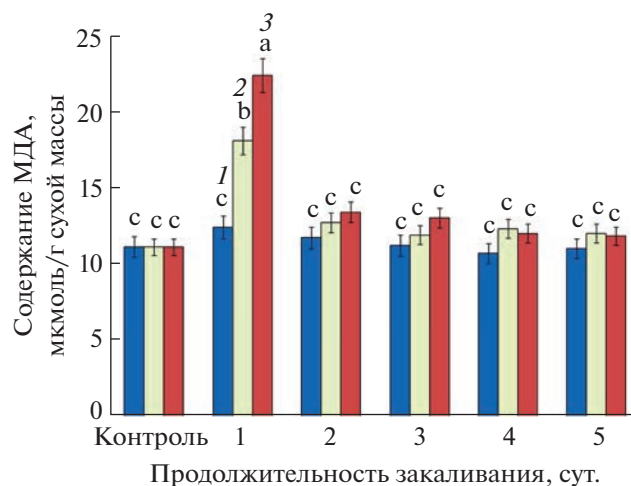


Рис. 3. Изменение содержания МДА в листьях *A. thaliana* при закаливании растений в условиях фотопериодов различной продолжительности. 1 – 0 ч; 2 – 8 ч; 3 – 16 ч. Достоверные различия средних значений при $P < 0.05$ отмечены разными латинскими буквами над барами.

с последующей оценкой их выживаемости, а также измерение величины выхода электролитов из листовой ткани в водную фазу. Оба метода дают достоверные результаты оценки степени повреждения растений низкими температурами и широко применяются в научных исследованиях [16].

Полученные нами данные подтвердили чрезвычайно важную роль света в закаливании растений *A. thaliana*. Опыты показали, что растения *A. thaliana*, подвергнутые закаливанию в темноте не смогли сформировать устойчивость к морозу, согласно данным по выживаемости и выходу электролитов после промораживания (-6°C , 1 сут.), т.е. они не отличались от незакаленных растений. В то же время, растения *A. thaliana* закаленные на свету разной продолжительности (8 ч и 16 ч) к концу периода низкотемпературного закаливания (5 сут.) значительно повысили свою устойчивость к морозу. На 5 сут. закаливания величина выхода электролитов и показатели выживаемости растений при обоих вариантах используемого фотопериода практически не отличались. Нужно отметить, что продолжительность фотопериода при закаливании влияла на скорость формирования устойчивости к морозу. Если при 8-часовом фотопериоде 100% уровень выживаемости тестируемых растений достигался после 3 сут. закаливания, то при 16-часовом фотопериоде 100% промороженных растений выживали уже после первых суток низкотемпературного закаливания.

Совместное действие низких положительных температур и света имеет важнейшее значение для эффективного закаливания растений [17]. Наиболее очевидной ролью света в процессе за-

каливания является фотосинтетическая фиксация углерода, которая необходима для обеспечения растений энергией и субстратами для синтеза веществ с защитным эффектом [3]. В наших экспериментах все растения *A. thaliana*, закаливающиеся на свету, сохраняли фотосинтетическую активность. Интенсивность видимого фотосинтеза растений при закаливающих температурах снижалась в 2 раза, по сравнению с незакаленными растениями независимо от продолжительности фотопериода.

Важной особенностью CO_2 -газообмена растений *A. thaliana* являлось то, что интенсивность видимого фотосинтеза при закаливании уменьшалась в меньшей степени, чем интенсивность темнового дыхания. Это приводило к 1.6–1.9 кратному увеличению отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание в посуточной динамике закаливании, что является предпосылкой накопления большого количества продуктов фотосинтеза в условиях закаливающих температур [13]. Действительно, наши исследования показали многократное увеличение содержания сахаров, преимущественно в форме глюкозы, в динамике закаливании *A. thaliana* на свету различной продолжительности и отсутствие прироста содержания сахаров при закаливании в темноте. Эти результаты хорошо согласуются с данными по устойчивости растений *A. thaliana* к морозу (табл. 1, 2) и могут объяснять большие различия в эффективности их закаливания на свету и в темноте. Отсутствие фотосинтеза и его продуктов — сахаров не позволило растениям *A. thaliana* повысить свою устойчивость к морозу (-6°C , 1 сут.) даже при использовании низких положительных температур. Вариант с 16-часовым фотопериодом превосходил вариант с 8-часовым освещением, как по максимальным уровням накопления сахаров (почти на 40%), так и по скорости достижения этих уровней в посуточной динамике закаливании. При этом следует отметить, что различия в максимальных уровнях содержания сахаров к концу периода закаливании (~ 40 мг/г сухой массы при 16-часовом фотопериоде и ~ 30 мг/г сухой массы при 8-часовом фотопериоде) не приводили к существенным различиям в устойчивости *A. thaliana* к морозу. 100% уровень выживаемости замороженных растений *A. thaliana* формировался при достижении содержания сахаров ~ 25 мг/г сухой массы. Данная величина по содержанию сахаров достигалась уже после 1 сут. закаливании при 16-часовом фотопериоде и после 3 сут. закаливании при 8-часовом фотопериоде, что оказывало влияние на скорость формирования устойчивости *A. thaliana* к морозу.

Известно, что при отрицательных температурах происходит замерзание воды в тканях растений, что приводит к их повреждению и даже гибели. Лед может образовываться внутри клетки, что всегда приводит к ее гибели, а также в межклетниках. Внеклеточное образование льда позволяет

сохранить жизнеспособность клеток, но вызывает их обезвоживание [18]. Поэтому стратегия закаливании растений к морозу базируется на избегании возникновения льда внутри клетки и повышении их устойчивости к межклеточному льду [3]. Реализация этой стратегии критически зависит от содержания сахаров, которые накапливаются в растениях во время низкотемпературного закаливании и выполняют стресс-протекторную функцию. Многократное увеличение содержания сахаров повышает осмотический потенциал клетки, что позволяет снижать температуру образования внутриклеточного льда и повышать устойчивость клеток к обезвоживанию [19]. Кроме того, сахара участвуют в метаболических процессах в качестве источника энергии и предшественников синтеза других соединений — криопротекторов, а также стабилизируют структуру мембран, молекул липидов и белков [20].

Помимо фотосинтетической роли, свет также может играть сигнальную роль при закаливании, которая, по-видимому, опосредована генерацией АФК и накоплением продуктов ПОЛ. При низких положительных температурах, необходимых для закаливании, скорость переноса электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов может быть избыточной по сравнению со скоростью ферментативных реакций цикла Кальвина. Это может приводить к перевосстановленности компонентов ЭТЦ хлоропластов и провоцировать значительное увеличение скорости генерации АФК и продуктов ПОЛ [21, 22]. В нашей работе, интенсивность ПОЛ в динамике закаливании была определена по содержанию одного из конечных продуктов процесса — МДА, который рассматривается как маркер окислительного стресса [23]. В течение всего периода закаливании *A. thaliana* в темноте, содержание МДА оставалось стабильным, что свидетельствует об отсутствии развития окислительного стресса при действии низкой положительной температуры в отсутствие света. Напротив, в вариантах с 8- и 16-часовым фотопериодами наблюдался существенный — в 1.7 и в 2 раза, соответственно, рост содержания МДА в 1 сут. закаливании с последующим снижением до уровня контрольных значений. Отчетливо выраженный транзиторный характер изменения содержания МДА в листьях *A. thaliana*, а также высокая эффективность низкотемпературного закаливании на свету различной продолжительности, может свидетельствовать о сигнальной роли продуктов ПОЛ в первые сутки закаливании. Известно, что реализация сигнальной функции АФК и продуктов ПОЛ может осуществляться через регуляцию кальциевого статуса клеток путем влияния на интенсивность поступления ионов Ca^{2+} , как второго мессенджера, в цитозоль [24] и последующего фосфорилирования сигнальных белков [25], а также через изменение потенциала редокс-чув-

ствительных клеточных систем [21]. Кроме того, в ответ на рост АФК и продуктов ПОЛ, в клетке изменяется экспрессия генов, кодирующих антиоксидантные ферменты (СОД, аскорбатпероксидазы, каталазы), и происходит их синтез *de novo*, а также возрастает уровень неферментативных антиоксидантов (глутатиона, аскорбата, флавоноидов, токоферолов) [26]. На основании полученных нами данных можно предположить, что за счет активации антиоксидантных защитных систем снижался уровень АФК и интенсивность ПОЛ в клетках *A. thaliana* уже начиная со 2 сут. закаливания в вариантах с 8- и 16-часовым фотопериодами. Возможность избежать окислительное повреждение при сохранении фотосинтетической активности растений, по-видимому, являлось одним из важных условий высокой эффективности низкотемпературного закаливания *A. thaliana*.

В литературе имеются данные о том, что сигнальная роль света при закаливании растений к морозу также может осуществляться при помощи фитохромов и заключается в положительной регуляции экспрессии индуцированных холодом генов. Было показано, что закаливание растений *A. thaliana* на свету активировало в два раза больше генов, по сравнению с закаливанием в темноте [27]. Анализ экспрессии генов *A. thaliana* показал, что фитохромы участвуют в светоопосредованной передаче сигналов для активации экспрессии большого количества генов, включая гены *CBF1-3* [28]. Факторы транскрипции CBF1-3 в свою очередь контролируют устойчивость растений к холодовому стрессу, регулируя экспрессию генов холодового ответа (*COR*) [29, 30]. *COR*-гены быстро индуцируются в ответ на низкие температуры и играют значительную роль в развитии устойчивости растений к морозу. К числу основных продуктов *COR*-генов относятся ферменты биосинтеза осмопротекторов, белки позднего эмбриогенеза (LEA), протеинкиназы, а также белки, связанные с метаболизмом липидов и модификациями клеточной стенки. Накопление данных веществ способно существенно повысить устойчивость растительных клеток к морозу [31].

Таким образом, на основе литературных и экспериментальных данных можно констатировать, что для формирования повышенной устойчивости *A. thaliana* к морозу требуется сочетание низкой положительной температуры и света, который при закаливании выполняет фотосинтетическую и сигнальную функции. Успех низкотемпературного закаливания растений зависит от взаимодействия между световыми и низкотемпературными сигналами, которые участвуют в регуляции этого процесса [17]. Основываясь на результатах наших экспериментов, можно предположить, что опосредованная через генерацию АФК и накопление продуктов ПОЛ сигнальная функция света имеет важное значение для запуска процесса низкотем-

пературного закаливания. В пользу этого предположения свидетельствуют установленное транзитное увеличение содержания МДА в первые сутки закаливания на свету и отсутствие изменений в содержании МДА при закаливании в темноте.

Не отрицая важность сигнальной функции, мы считаем, что эффективность низкотемпературного закаливания *A. thaliana*, главным образом, определялась фотосинтетической функцией света. Наши эксперименты показали, что продолжительность фотопериода не имеет для закаливания *A. thaliana* такого принципиального значения, как для древесных растений [6]. Растения *A. thaliana* были способны развивать повышенную устойчивость к морозу при закаливании как на коротком фотопериоде (8 ч), так и на длинном (16 ч). Продолжительность фотопериода оказывала влияние не столько на способность к формированию повышенной морозоустойчивости растений, сколько на скорость формирования такой устойчивости. Более длительная работа фотосинтетического аппарата *A. thaliana* при 16 ч фотопериоде значительно повышала скорость накопления сахаров при закаливании и, соответственно, скорость формирования устойчивости к морозу по сравнению с 8 ч фотопериодом. Следовательно, эффективность закаливания растений *A. thaliana* зависит от продолжительности функционирования процесса фотосинтеза и, соответственно, от скорости накопления продуктов фотосинтеза — сахаров в условиях действия низких положительных температур.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nievola C.C., Carvalho C.P., Carvalho V., Rodrigues E. Rapid responses of plants to temperature changes // *Temperature*. 2017. V. 4. P. 371. <https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1377812>
2. Larcher W. *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 2003. P. 513.
3. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. 54 с.
4. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // *Planta*. 2012. V. 235. P. 1091. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1641-y>
5. Rihan H.Z., Al-Issawi M., Fuller M.P. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance // *J. Plant Interact.* 2017. V. 12. P. 143. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1308568>

6. Weiser C.J. Cold resistance and injury in woody plants: Knowledge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage // Science. 1970. V. 169. P. 1269.
<https://doi.org/10.1126/science.169.3952.1269>
7. Maurya J.P., Bhalerao R.P. Photoperiod and temperature mediated control of growth cessation and dormancy in trees: a molecular perspective // Ann. Bot. 2017. V. 120. P. 351.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcx061>
8. Wanner L.A., Junttila O. Cold-Induced Freezing Tolerance in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 1999. V. 120. P. 391.
<https://doi.org/10.1104/pp.120.2.391>
9. Lee C.M., Thomashow M.F. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* // PNAS. 2012. V. 109. P. 15054.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1211295109>
10. Трунова Т.И. Световой и температурный режимы при закаливании озимой пшеницы и значение олигосахаридов для морозостойкости // Физиология растений. 1965. Т. 12. С. 85.
11. Xin Z., Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures // Plant Cell Environ. 2000. V. 23. P. 893.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00611.x>
12. Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.C., Nunes M.A. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 283.
<https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833>
13. Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. Changes in Photosynthesis, Dark Respiration Rates and Photosynthetic Carbon Partitioning in Winter Rye and Wheat Seedlings during Cold Hardening // J. Plant Physiol. 1999. V. 155. P. 734.
14. Туркина М.В., Соколова С.В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука, 1971. 7 с.
15. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
16. Zuther E., Schulz E., Childs L.H., Hinch D.K. Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. P. 1860.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02522.x>
17. Catala R., Medina J., Salinas J. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis* // PNAS. 2011. V. 108 P. 16475.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1107161108>
18. Ashworth E.N., Pearce R.S. Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species // Planta. 2002. V. 214. P. 798.
<https://doi.org/10.1007/s00425-001-0683-3>
19. Reyes-Diaz M., Ulloa N., Zuniga-Feest A., Gutierrez A., Gidekel M., Alberdi M., Corcuera L.J., Bravo L.A. *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 3687.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erl125>
20. Deryabin A.N., Trunova T.I. Colligative effects of solutions of low-molecular sugars and their role in plants under hypothermia // Biol Bull Russ Acad Sci. 2021. V. 48. P. 29.
<https://doi.org/10.1134/S1062359021060042>
21. Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // Russ. J. Plant Physiol. 2012. V. 59. P. 141.
<https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
22. Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications // Antioxid. Redox Signal. 2009. V. 11. P. 861.
<https://doi.org/10.1089/ars.2008.2177>
23. Shulaev V., Oliver D.J. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 367.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.077925>
24. Mori I.C., Schroeder J.I. Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca²⁺ Channels: A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 702.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.042069>
25. Pitzschke P., Hirt H. Mitogen Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling in Plants // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 351.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.079160>
26. Foyer C.H., Noctor G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 1866.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
27. Soitamo A.J., Piippo M., Allahverdiyeva Y., Battchikova N., Aro E.M. Light has a specific role in modulating *Arabidopsis* gene expression at low temperature // BMC Plant Biology. 2008. V. 8. P. 13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-13>
28. Kim H.J., Kim Y.K., Park J.Y., Kim J. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2002. V. 29. P. 693.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01249.x>
29. Crosatti C., Polverino de Laureto P., Bassi R., Cattivelli L. The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene cor14b and the accumulation of the corresponding protein // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 671.
<https://doi.org/10.1104/pp.119.2.671>
30. Zhang R., Gonze D., Hou X., You X., Goldbeter A. A computational model for the cold response pathway in plants // Frontiers in physiology. 2020. V. 11. e591073.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.591073>
31. Zhao C., Zhang Z., Xie S., Si T., Li Y., Zhu J.K. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2016. V. 171. P. 2744.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.00533>

УДК 581.1

УСТОЙЧИВОСТЬ К АЛЬТЕРНАРИОЗУ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ *ProSmAMP1* ПОД КОНТРОЛЕМ СВЕТОИНДУЦИБЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА *Cab*

© 2023 г. Д. В. Беляев^{a,*}, Н. О. Юрьева^a, Д. В. Терешонок^a, М. К. Деревягина^b, А. А. Мелешин^b

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

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха, Красково, Россия

*e-mail: bdv@ippras.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

Геном растения звездчатка *Stellaria media* содержит семейство генов гевеин-подобных антимикробных пептидов, про некоторые из которых известно, что они кодируют два пептида, высвобождающиеся из продукта трансляции в результате пост-трансляционного протеолиза. Ранее было показано, что данные пептиды подавляют рост бактерий и грибов, в том числе, патогенов картофеля *Alternaria solani* и *Alternaria alternata*. В данной работе один из таких генов, *ProSmAMP1*, был введен в геном картофеля под контролем светоиндуцибельного промотора гена *Cab* мягкой пшеницы. Полученные трансгенные линии экспрессировали мРНК *ProSmAMP1* в течение нескольких вегетативных пассажей и их устойчивость к альтернариозу была оценена по нескольким показателям заражения отделенных листьев, причем растения с наибольшей экспрессией трансгена продемонстрировали также наибольшую устойчивость.

DOI: 10.31857/S0015330322600693, EDN: IBNUOH

ВВЕДЕНИЕ

Картофель является одной из важнейших продовольственных культур. Величина и качество урожая клубней картофеля сильно зависят как от погодных условий конкретного вегетационного периода, так и от поражения посадок фитопатогенами. Второй, по степени вредоносности, урон урожаю клубней картофеля наносит поражение посадок возбудителями альтернариоза грибами рода *Alternaria*. Поражение листьев растений приводит к снижению фотосинтезирующей поверхности и как результат к потерям урожая клубней. В 2018 г. потери урожая клубней картофеля в Швеции, Дании, Германии, Сербии и России превысили 50% [1]. Кроме того, было показано, что большинство видов альтернарии вызывают сильные аллергические реакции у людей, в частности, споры многих видов альтернарии относят к аэроаллергенам, и средняя концентрация 100 спор/м³ уже представляет риск возникновения респираторных аллергических заболеваний, а наличие мицелия альтернарии как на листьях, так и на пораженных клубнях может нанести значительный вред здоровью человека [2].

Заражение альтернариозом в Европе чаще всего начинается в середине июля, особенно когда погода сухая и жаркая. Наиболее сильно поражаются нижние ярусы более старых растений. На листе появляется некроз, окруженный хлоротичными тканями, с нижних листьев поражение распространяется на верхние ярусы. Зараженные растения формируют мелкие клубни с пониженным содержанием сухого вещества [3]. Во время дождей конидии смываются с листьев, попадают на почву и заражают клубни. На клубнях появляются темные вдавленные некрозы и сухая твердая гниль. Это вызывает потери при хранении клубней и снижение их пищевых качеств, а также ухудшает их семенные качества, снижая способность прорастания [4]. Возбудители альтернариоза *Alternaria solani* и *Alternaria alternata* относятся к надцарству (домени) Eukaryota, царству Fungi, отделу Deuteromycota, классу Nyphomycetes, порядку Nyphales и семейству Porosporae [5]. Грибы рода *Alternaria* являются полициклическими патогенами, способными реализовать несколько циклов инфицирования растений в течение вегетационного периода. Переживавший в виде мицелия или конидий в почве с

растительными остатками патоген формирует споры, которые могут проникать в ткани непосредственно через эпидермис, через устьица или повреждения, вызванные механическим путем или вредителями, а также через увеличенные чечевички клубней чаще всего в период хранения и посадки [6]. К наиболее распространенным механизмам устойчивости к фитопатогенам, в том числе, возбудителю альтернариоза относится синтез в тканях растения алкалоидов и стероидных соединений [7]. В лабораторных исследованиях было выявлено высокое содержание фенолов в листьях растений, устойчивых к альтернариозу [8]. Кроме того, было показано, что проникновение этого патогена в клетку ингибируется рядом ферментов клеточной стенки: фенилаланин аммоний лиазой, пероксидазой, хитиназой и полифенол оксидазой [9]. Инфицирование как листьев, так и клубней растения картофеля происходит на свету. Поэтому механизмы защиты растения от проникновения патогена в условиях освещенности (в дневных условиях, на свету) играют большую роль в устойчивости растения. Для ускорения прорастания семенных клубней, улучшения дальнейшего роста растений картофеля в производстве применяется технология предпосадочного озеленения клубней [10]. С коммерческой точки зрения наибольший экономический эффект приносит выращивание сортов картофеля, устойчивых к альтернариозу. Но таких сортов очень немного и они обычно имеют поздние сроки созревания [11]. Создание устойчивых к патогену сортов картофеля традиционным способом половой гибридизации часто затруднено, так как во многих случаях высокая устойчивость к альтернариозу сопровождается низкой клубневой продуктивностью [12]. В случае использования межвидовых скрещиваний с дикими видами во многих случаях устойчивость к патогену определяется повышенным биосинтезом гликоалкалоидов, флавоноидов и лигнина, что ухудшает качество клубней и может сделать их опасными для здоровья человека [13]. Альтернативным методом создания сортов картофеля, устойчивых к фитопатогенам, является введение в геном ценных генов с использованием генетических конструкций. В настоящее время большой интерес представляют гены, кодирующие антимикробные пептиды из съедобных для человека растений: пшеницы, ячменя, огурца, люцерны [14–17], а также из лекарственных растений, например, гинкго билоба [18] и черного тмина *Nigella sativa* [19].

Ген ProSmAMP1 был выделен из употребляемого в пищу в Ирландии, Великобритании и других странах растения звездчатка (*Stellaria media*) [20], также используемого и в качестве корма для промысловых рыб [21]. Кроме того, экстракты из разных органов этого растения используются в медицинских целях [22]. Антимикробная активность AMP из семян растения звездчатки (*Stellar-*

ia media) была продемонстрирована как *in vitro*, так и в трансгенных растениях картофеля и табака [23–25]. Было показано многими исследователями, что наиболее часто от заражения вирусами, фитопатогенными грибами и бактериями страдают надземные органы растений, которые находятся под воздействием естественного освещения [26]. С точки зрения биобезопасности, важно отсутствие в органах сельскохозяйственных культур, у которых в потребительских целях используют подземную часть, например, в корнеплодах свеклы или моркови, или в клубнях картофеля, синтеза любых посторонних соединений, связанных с устойчивостью к патогенам. Поэтому специфичная экспрессия генов AMP, например, только на свету, представляет особый интерес.

Целевой экспрессии генов АМР на свету можно достигнуть использованием в генетических конструкциях светоиндуцибельных промоторов. Свет регулирует множество процессов в растении, в том числе, путем светоиндуцибельной экспрессии регуляторных белков. Сильные светоиндуцибельные промоторы также регулируют экспрессию эффекторных белков, представленных в клетке в значительно больших количествах, и к поиску таких промоторов сохраняется интерес [27]. Нами выбран для данной работы промотор Cab, контролирующей экспрессию хлорофилл-связывающего белка, участвующего в биосинтезе хлорофиллов *a* и *b* [28]. Результаты эксперимента с трансгенными растениями табака показали, что на свету активность промоторов семейства Cab повышалась, по сравнению с темнотой, в 1.5–60 раз, причем высокий уровень экспрессии наблюдался во всех фотосинтезирующих органах [29].

Целью нашего эксперимента было создание устойчивых к возбудителю альтернариоза растений картофеля с повышенной безопасностью путем использования гена из съедобного растения звездчатки (*Stellaria media*) и его экспрессии только на свету, но не в клубнях, которые формируются и хранятся в темноте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фрагмент, содержащий кДНК гена *proSmAMP1* вместе с терминатором транскрипции гена нопалинсинтазы [30] был субклонирован из pBI-proSmAMP1 [23] по сайтам XbaI и EcoRI в соответствующие сайты полилинкера агробактериального вектора pCambia2300. Промотор гена белка, связывающего хлорофиллы *a/b* (Cab) [28] был амплифицирован из ДНК мягкой пшеницы *T. aestivum* с помощью праймеров WC412F и WC898R (табл. 1), обработан рестриктазами HindIII и XbaI и клонирован в соответствующие сайты вектора pCambia2300 с геном *proSmAMP1*, полученного как описано выше. На рис. 1 представлена карта Т-ДНК полученной конструкции для агробак-

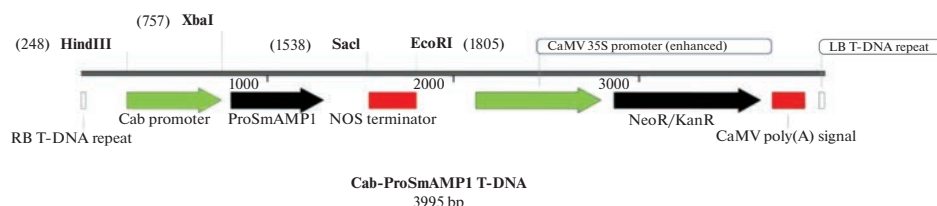


Рис. 1. Т-ДНК генетической конструкции Cab-ProSmAMP1.

териальной трансформации картофеля, названной Cab-ProSmAMP1.

Для агробактериальной трансформации использовали листовые и стеблевые экспланты четырехнедельных асептических растений восприимчивого к альтернариозу [25] сорта Удача, предоставленных коллекцией оздоровленных растений картофеля ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха. Исходные растения выращивали на безгормональной агаризованной среде MS, содержащей тиамин 1 мг/л, пиридоксин 1 мг/л, сахарозу 2%, pH 5.8 в климатической камере ИФР РАН при температуре +22°C, 16-часовом фотопериоде и влажности 75%. Трансформация была проведена в соответствии с методикой [31] с использованием штамма агробактерии AGL0 [32]. Регенеранты, сформировавшие хорошо развитый зеленый побег и корни на твердой среде MS с добавлением в качестве селективного фактора 50 мг/л канамицина и 300 мг/л цефотаксима для ингибирования роста агробактерии, были тестированы на наличие целевого гена (праймеры AMPSmF/R) и отсутствие латентной формы бактерии (праймеры *virE2*) с использованием метода ПЦР-анализа [25].

Для определения уровня экспрессии гена *SmAMP* под светочувствительным промотором *Cab* на

свету, линии с подтвержденной вставкой целевого гена выращивали на агаризованной безгормональной среде MS в пробирках в течение 4 недель. Анализ проводили в трехкратной повторности. Для получения микроклубней стеблевые экспланты, имеющие одну пазушную почку, помещали в 250 мл колбы с жидкой безгормональной MS средой, содержащей 2% сахарозы, в условиях темноты для формирования столонов и затем среду заменяли на аналогичную с содержанием 8% сахарозы для индукции клубнеобразования и роста микроклубней в соответствии с разработанной ранее методикой [33]. Часть полученных микроклубней оставляли в условиях темноты, а часть — переносили на свет.

Для измерения экспрессии целевого гена выделяли РНК из образцов листьев и клубней трансгенных и контрольных растений по методике, описанной в [34]. Количество РНК гена *proSmAMP1* определяли путем количественной ОТ-ПЦР (кОТ-ПЦР). Обратную транскрипцию проводили со случайным праймером (N10) при температурах от 37 до 45°C, затем продукты реакции амплифицировали с праймерами и зондами TaqMan для целевого гена *proSmAMP1*, а также для гена *Cyp1*, выбранного нами для нормировки [35].

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР и кОТ-ПЦР

Применение	Название	Последовательность	Источник
ПЦР промотора <i>Cab</i>	WC412F	AAAAAGCTTACGATCACTCCGACAATCA	
ПЦР промотора <i>Cab</i>	WC898R	AATCTAGATGCGCTGCACTTATGGT	
Проверка трансгенных растений на заражение агробактерией	<i>virE2 agl+</i>	CGAATACATTCTCGTGCGTCAAAC	
Проверка трансгенных растений на заражение агробактерией	<i>virE2agl-</i>	TTTCGAGTCATGCATAATGCCTGAC	
кОТ-ПЦР	N10	NNNNNNNNNN	
кОТ-ПЦР	AMPSmF	TGTGGTTCAGGCCCTAAGTA	[23]
кОТ-ПЦР	AMPSmR	AGCGTCAGTAGGCTCAATCT	[23]
кОТ-ПЦР	ProbeAMPS	FAM-TGCGCCCAACAACACTCCTCTTTCTG-BHQ1	[23]
кОТ-ПЦР	CyP-F	AGGTGTTGGAAAGATGGGTA	[35]
кОТ-ПЦР	CyP-R	TCACCTCCTTGACACATGAAC	[35]
кОТ-ПЦР	TqmCyP	ROX-TACAAGGGCTCAACCTTCCACCGT-BHQ2	[35]

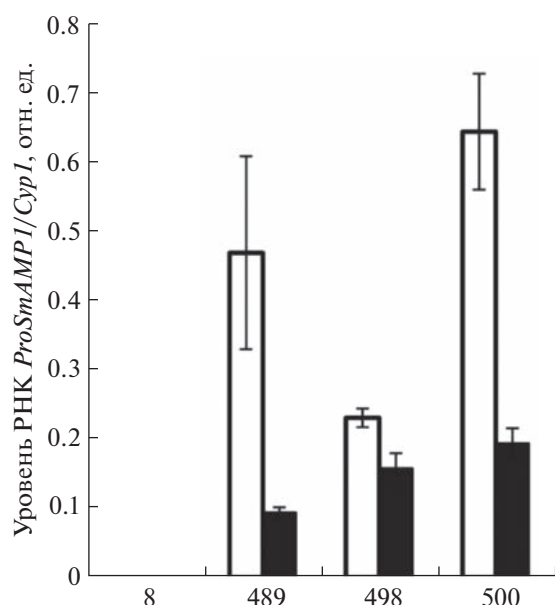


Рис. 2. Уровень РНК *ProSmAMP1* в клубнях, выращенных на свету (□) или в темноте (■). Уровень транскриптов *ProSmAMP1* выражали как отношение количества транскриптов *ProSmAMP1* к количеству транскриптов *Cyp1* в образце РНК, измеренное с помощью кОТ-ПЦР. 8 — исходный сорт Удача, трехзначные числа — трансгенные линии.

Последовательности праймеров для кОТ-ПЦР приведены в таблице 1.

Оценка устойчивости к возбудителю альтернариоза. Пробирочные растения трансгенных линий были размножены в культуре *in vitro* и высажены в теплице в 1 л горшки с торфяным грунтом “Воздушный” (www.biud.ru) по 5 растений на генотип. В теплице были естественное освещение и терморегуляция, полив осуществлялся в соответствии с необходимостью. В фазе бутонизации (45–50 сут. с момента высадки в грунт), с трех хорошо развитых растений из средней части было взято по одному сложному листу. В лабораторных условиях были отделены по 3 терминальные доли каждого из трех листьев (всего 9 долей) и помещены в подносы на влажную фильтровальную бумагу нижней стороной вверх. Показатели устойчивости растений к альтернариозу оценивали, как описано нами ранее [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для создания генетической конструкции для трансформации картофеля геном *ProSmAMP1* был использован вектор pCambia2300 (<https://cambia.org/welcome-to-cambialabs/cambialabs-projects/cambialabs-projects-legacy-pcambia-vectors-pcambia-legacy-vectors-1/>). В отличие от более ранних векторов семейства pBI [30], структура его Т-ДНК позволяет удобно клонировать целевые гены бли-

же к правой границе Т-ДНК по сравнению с селективным геном, что является преимуществом. Проникновение Т-ДНК в ядро растительной клетки обычно начинается с правой границы Т-ДНК [36]. В некоторых случаях, однако, лишь часть Т-ДНК попадает в ядро и затем встраивается в хромосому [37], и присутствие селективного гена рядом с правой границей может привести к получению растений, у которых в результате такого события присутствует селективный ген устойчивости к антибиотику, с помощью которого были отобраны трансформанты, а более далекий от правой границы целевой ген отсутствует или поврежден.

Для проведения эксперимента был выбран раннеспелый сорт картофеля Удача. По результатам наших предыдущих исследований [25], во время оценки устойчивости к альтернариозу нескольких сортов картофеля, раннеспелый сорт Удача продемонстрировал высокую восприимчивость к возбудителю альтернариоза *Alternaria solani*. В результате агробактериальной трансформации листовых эксплантов сорта Удача было получено 12 регенерантов, в 9 из которых была обнаружена вставка целевого гена. Эффективность трансформации (на 1 исходный эксплант) составила 8.2%, а на 1 полученный регенерант — 75.0%. С использованием пары праймеров *virE2* (табл. 1) подтвердили отсутствие латентной формы агробактерии у трансгенных линий.

Чтобы выявить активность светоиндуцибельного промотора *Sab* в клубнях, были получены микроклубни для трансгенных линий и исходного сорта картофеля. Анализ экспрессии гена *SmAMP* под промотором *Sab* в микроклубнях трансгенных линий картофеля на свету или в темноте подтвердил литературные данные об активации промотора *Sab* светом [28], хотя разница в накоплении мРНК трансгена на свету и в темноте варьировала у разных трансгенных линий (рис. 2).

На рис. 3 в виде двумерной диаграммы даны, по оси абсцисс, экспрессия трансгена, и по оси ординат, показатели восприимчивости к альтернариозу контрольных (8) и трансгенных линий: диаметр поражения, интенсивность спороношения и комплексный параметр индекс поражения, полученный, в частности, с использованием первых двух показателей. Во всех трансформированных линиях присутствует экспрессия трансгена, которая относительно однородна от линии к линии: наименьшее значение (линия 493) составляет 43% от наиболее сильной экспрессии (линия 499). Трансформированные линии отличаются также по устойчивости к альтернариозу. С точки зрения селекции, наиболее интересна линия 499, у которой наибольшая экспрессия *ProSmAMP1* сочетается с наибольшей устойчивостью к заражению альтернарией. У остальных линий устойчивость ва-

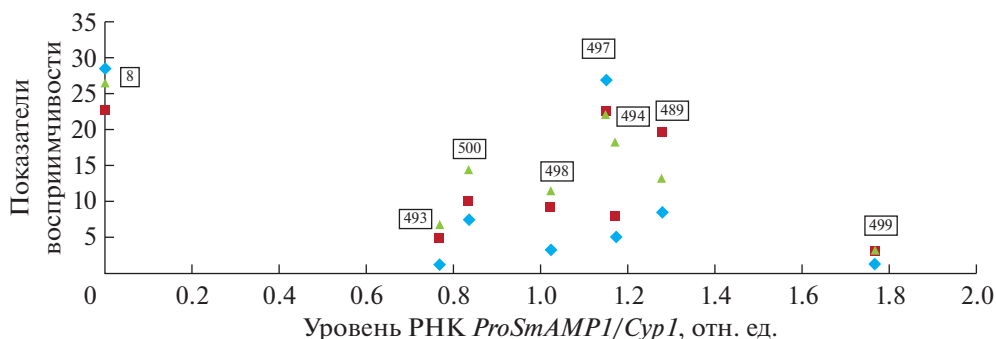


Рис. 3. Двумерная диаграмма взаимосвязи экспрессии трансгена *proSmAMP1* (уровней РНК) в листьях, выращенных на свету, и показателей восприимчивости трансгенных линий (трехзначные числа) и контрольных растений (отмечены 8). Уровень транскриптов *ProSmAMP1* выражали как отношение количества транскриптов *ProSmAMP1* к количеству транскриптов *Cyp1* в образце РНК, измеренное с помощью кОТ-ПЦР. Ординаты точек равны: ◇ — индексу поражения; □ — диаметру поражения; △ — 10X (интенсивность спороношения).

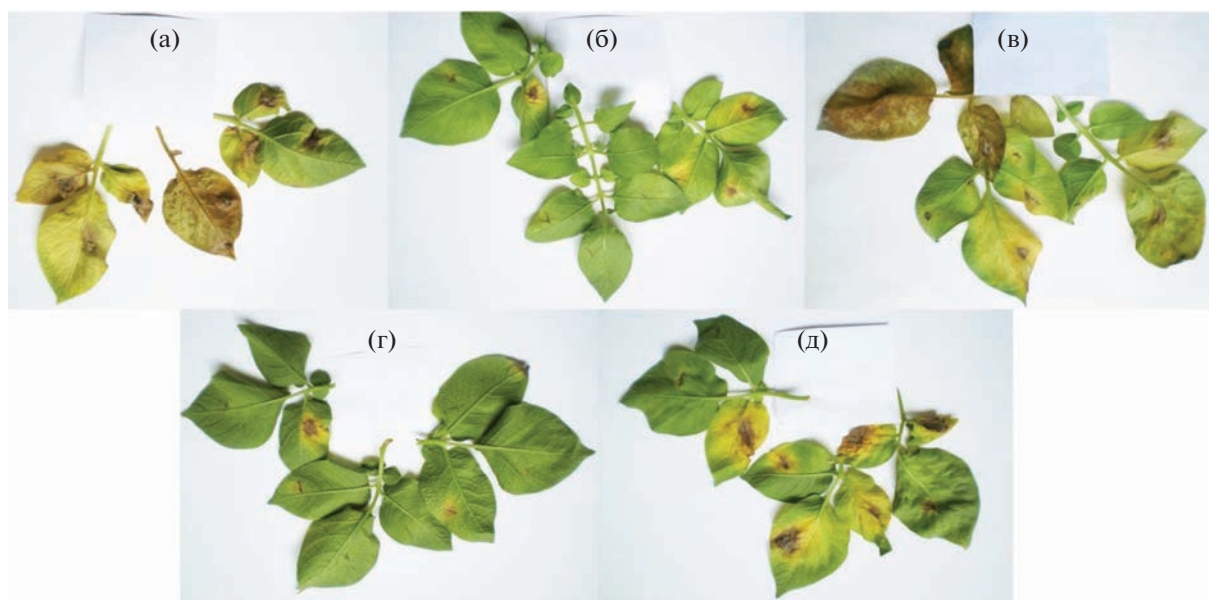


Рис. 4. Фотографии зараженных листьев. (а) — исходный сорт Удача; (б) — линия 493; (в) — линия 498; (г) — линия 499; (д) — линия 500.

рырует от величины устойчивости исходного сорта (8) до абсолютной устойчивости в смысле, количественно определенном использованными нами методами. Помимо наличия антимикробных пептидов, устойчивость растений к патогенам определяется многими другими факторами: механическими барьерами, тургором, рецепцией, фитоалексинами, что может быть объяснением различий в устойчивости трансгенных линий с близкими значениями экспрессии трансгена на рис. 2.

На рис. 4 показаны типичные симптомы заражения листьев грибами *Alternaria*, использованные для определения показателей восприимчивости исходной и трансгенных линий. Видно, что

листья исходного сорта и линий с умеренной устойчивостью желтеют и увядают даже там, где рост гриба не виден, в то время как у линий с высокой устойчивостью поражение остается локализованным вокруг места укола суспензией грибов (линия 499).

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе продемонстрирована повышенная устойчивость к альтернариозу растений картофеля, трансформированных геном антимикробных пептидов *ProSmAMP1* под контролем светоиндуцибельного промотора гена *Cab* из мягкой пшеницы. Устойчивость растений была сравнима с

таковой у растений, трансформированных этим же геном под контролем неспецифического промотора 35S [25]. В целом, наши результаты подтверждают литературные данные об активации экспрессии *cab* светом [28], хотя некоторое количество транскриптов присутствует и в выращенных в темноте клубнях. Однако по литературным данным для других видов растений, экспрессия гена *cab D. tertiolecta*, например, повышалась при уменьшении уровня освещенности, что было показано путем измерения уровня транскрипции данного гена, накопления его мРНК и белка [38]. По-видимому, данная водоросль компенсирует уменьшение освещенности увеличением содержания хлорофилла и светособирающих комплексов, и этот эффект длится несколько часов, после чего экспрессия *cab* опять падает.

В современной литературе [39] различия в экспрессии гена считаются существенными, если уровни накопления его транскрипта отличаются более чем в два раза. Наши данные показывают, однако, весьма небольшие различия в уровне содержания транскрипта трансгена: наименьшая экспрессия (у линии 493) составила 43% от уровня экспрессии трансгена в линии 499 с максимальной экспрессией. Такие небольшие колебания уровня генной экспрессии между линиями, возможно, являются следствием процедуры трансформации, во время которой происходил отбор трансформированных клеток на среде с канамицином. Для регенерации был необходим высокий уровень экспрессии гена *NPTII*, когда Т-ДНК, в которой содержался и целевой ген, была интегрирована в транскрипционно активную область хромосомы картофеля. Таким образом, селекция на канамицине также отбирает для дальнейшей регенерации трансформированные клетки с сильной экспрессией целевого гена. В ряде работ, однако, трансформация растений проводилась двумя Т-ДНК на одной или различных плаزمидных агробактериях, причем одна Т-ДНК несла селективный ген, а другая — целевой ген, и большинство полученных трансгенных линий содержали, помимо селективного, также и целевой ген, интегрированный в удаленный от места интеграции целевого гена локус. В таких трансгенных растениях экспрессия целевого гена больше не находится под давлением отбора и может варьировать в более широких пределах, чем когда и селективный, и целевой ген присутствуют на одной Т-ДНК [40]. Помимо растений с сильной экспрессией целевого гена, в этом случае можно получить линии со слабой экспрессией, что может быть преимуществом, если продукт гена, антимикробный пептид, в высокой концентрации образует неактивные олигомеры. В случае пептидов семейства SmAMP1х, однако, это представляется маловероятным, так как они имеют лидерный пептид и, по-видимому, экскретируются в апопласт [23].

Достоинством методики трансформации растений с помощью раздельных Т-ДНК для целевого и селективного генов является возможность получить безмаркерное потомство в последующих семенных поколениях [40].

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042600086-7).

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. Schepers H., Hausladen H., Hansen J.G. Epidemics and control of early & late blight, 2017 & 2018 in Europe // Proceedings of the seventeenth EuroBlight Workshop. 2019. V. 19. P. 11. https://doi.org/https://agro.au.dk/file-admin/euroblight/Workshops/Proceedings/Special_Report_19-Totaal_LR.pdf
2. Gravesen S. Fungi as a cause of allergic disease // Allergy. 1979. V. 34. P. 135. <https://doi.org/10.1111/J.1398-9995.1979.TB01562.X>
3. Tsedaley B. Review on early blight (*Alternaria* spp.) of potato disease and its management options // J. Biol. Agricul. Healthcare. 2014. V. 4 P. 191. <https://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/18650>
4. Adolf B., Andrade-Piedra J., Bittara Molina F., Przetakiewicz J., Hausladen H., Kromann P., Lees A., Lindqvist-Kreuzer H., Perez W., Secor G.A. Fungal, oomycete, and plasmodiophorid diseases of potato // The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind. 2019. V. 9. P. 307. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_9
5. Van Der Waals J.E., Korsten L., Aveling T.A.S. A review of early blight of potato // African Plant Protection. 2001. V. 7. P. 1
6. Kumar Chaudhary A., Yadav J., Kumar Gupta A., Gupta K. Integrated disease management of early blight (*Alternaria Solani*) of potato // Tropical Agrobiodiversity. 2021. V. 2. P. 77. <https://doi.org/10.26480/trab.02.2021.77.81>
7. Shinde B.A., Dholakia B.B., Hussain K., Panda S., Meir S., Rogachev I., Aharoni A., Giri A.P., Kamble A.C. Dynamic metabolic reprogramming of steroidal glycol-alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis may impart early blight resistance in wild tomato (*Solanum arcanum* Peralta) // Plant Mol. Biol. 2017. V. 95. P. 411. <https://doi.org/10.1007/S11103-017-0660-2/FIGURES/7>
8. Roddick J.G., Rijnbergen A.L. Effect of steroidal glycoalkaloids of the potato on the permeability of liposome membranes // Physiol. Plant. 1986. V. 68. P. 436. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb03378.x>
9. Yamunarani K., Jaganathan R., Bhaskaran R., Govindaraju P., Velazhahan R. Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes // Acta Physiol. Plant. 2004. V. 26. P. 281. <https://doi.org/10.1007/S11738-004-0018-7>

10. Johansen T.J., Mølmann J.A.B. Seed potato performance after storage in light at elevated temperatures // Potato Research. 2018. V. 61. P. 133.
<https://doi.org/10.1007/S11540-018-9363-6/FIGURES/3>
11. Henrique S.S.D., Zambolim L., Rodrigues F.A., Paul P.A., Pádua J.G., Ribeiro J.I. Field resistance of potato cultivars to foliar early blight and its relationship with foliage maturity and tuber skin types // Tropical Plant Pathology. 2014. V. 39. P. 294
12. Busnello F.J., Boff M.I.C., Agostinetto L., Souza Z. da S., Boff P. Potato genotypes reaction to early blight and late blight in organic cultivation // Ciência Rural. 2019. V. 49.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20180469>
13. Weber B.N., Jansky S.H. Resistance to *Alternaria solani* in Hybrids Between a *Solanum tuberosum* Haploid and *S. raphanifolium* // Phytopathology. 2012. V. 102. P. 214.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0146>
14. Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A., Korostyleva T.V., Kasianov A.S., Kovtun A.S., Makeev V.J., Shcherbakova L.A., Kudryavtsev A.M. Defensin-like peptides in wheat analyzed by whole-transcriptome sequencing: A focus on structural diversity and role in induced resistance // Peer J. 2019. V. 2019. P. e6125.
<https://doi.org/10.7717/PEERJ.6125/SUPP-16>
15. Toufiq N., Tabassum B., Bhatti M.U., Khan A., Tariq M., Shahid N., Nasir I.A., Husnain T. Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host // Braz. J. Microbiol. 2018. V. 49. P. 414.
<https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.05.007>
16. Moravčíková J., Matušíková I., Libantová J., Bauer M., Mlynárová L. Expression of a cucumber class III chitinase and Nicotiana plumbaginifolia class I glucanase genes in transgenic potato plants // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2004. V. 79. P. 161.
<https://doi.org/10.1007/S11240-004-0656-X>
17. Islam K.T., Velivelli S.L.S., Berg R.H., Oakley B., Shah D.M. A novel bi-domain plant defensin MtDef5 with potent broad-spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers // Sci. Rep. 2017.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16508-w>
18. Huang X., Xie W.J., Gong Z.Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba* // FEBS Letters. 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01834-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01834-2)
19. Vasilchenko A.S., Smirnov A.N., Zavriev S.K., Grishin E.V., Vasilchenko A.V., Rogozhin E.A. Novel thionins from black seed (*Nigella sativa* L.) demonstrate antimicrobial activity // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2017. V. 23. P. 171.
<https://doi.org/10.1007/S10989-016-9549-1/FIGURES/5>
20. Mithril C., Dragsted L.O. Safety evaluation of some wild plants in the New Nordic Diet // Food Chem. Toxicol. 2012. V. 50. P. 4461.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2012.09.016>
21. Yilmaz S., Ergün S. Chickweed (*Stellaria media*) leaf meal as a feed ingredient for tilapia (*Oreochromis mossambicus*) // J. Appl. Aquac. 2013. V. 25. P. 329.
<https://doi.org/10.1080/10454438.2013.851531>
22. Rogowska M., Lenart M., Srećec S., Ziája M., Parzonko A., Bazylko A. Chemical composition, antioxidative and enzyme inhibition activities of chickweed herb (*Stellaria media* L., Vill.) ethanolic and aqueous extracts // Industrial Crops and Products. 2017. V. 97. P. 448.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.12.058>
23. Shukurov R.R., Voblikova V.D., Nikonorova A.K., Komakhin R.A., Komakhina V.V., Egorov T.A., Grishin E.V., Babakov A.V. Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens // Transgenic Res. 2012. V. 21. P. 313.
<https://doi.org/10.1007/s11248-011-9534-6>
24. Vetchinkina E.M., Komakhina V.V., Vysotskii D.A., Zaitsev D.V., Smirnov A.N., Babakov A.V., Komakhin R.A. Expression of plant antimicrobial peptide pro-SmAMP2 gene increases resistance of transgenic potato plants to *Alternaria* and *Fusarium* pathogens // Russ. J. Genet. 2016. V. 52. P. 939.
<https://doi.org/10.1134/s1022795416080147>
25. Beliaev D.V., Yuorieva N.O., Tereshonok D.V., Tashlieva I.I., Derevyagina M.K., Meleshin A.A., Rogozhin E.A., Kozlov S.A. High resistance of potato to early blight is achieved by expression of the *Pro-SmAMP1* gene for hevein-like antimicrobial peptides from common chickweed (*Stellaria media*) // Plants. 2021. V. 10. P. 1395.
<https://doi.org/10.3390/PLANTS10071395>
26. Muhammad A.F., Naz F., Irshad G. Important fungal diseases of potato and their management-a brief review // Mycopath. 2013. V. 11. P. 45.
27. Timerbaev V., Dolgov S. Functional characterization of a strong promoter of the early light-inducible protein gene from tomato // Planta. 2019. V. 250. P. 1307.
<https://doi.org/10.1007/S00425-019-03227-X>
28. Nagy F., Boutry M., Hsu M.Y., Wong M., Chua N.H. The 5'-proximal region of the wheat Cab-1 gene contains a 268-bp enhancer-like sequence for phytochrome response. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 2537.
<https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1987.TB02541.X>
29. An G. Integrated regulation of the photosynthetic gene family from *Arabidopsis thaliana* in transformed tobacco cells // Mol. General Genet. 1987. V. 207. P. 210.
<https://doi.org/10.1007/BF00331580>
30. Bevan M. Binary agrobacterium vectors for plant transformation // Nucleic acids research. 1984. V. 12. P. 8711.
<https://doi.org/10.1093/NAR/12.22.8711>
31. Banerjee A.K., Prat S., Hannapel D.J. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. andigena) plants via *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation // Plant Sci. 2006. V. 170. P. 732.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.11.007>
32. Lazo G.R., Stein P.A., Ludwig R.A. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium* // BioTechnol. 1991. V. 9. P. 963.
<https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
33. Дерябин А.Н., Юрьева Н.О. Образование и морфометрические показатели микроклубней картофеля *in vitro* при разном составе сахаров в среде // Сельскохозяйственная биология. 2011. Т. 1. С. 54.
<http://www.agrobiology.ru/1-2011deryabin-eng.html>

34. Yuorieva N.O., Voronkov A.S., Tereshonok D.V., Osipova E.S., Platonova E.V., Belyaev D.V. An assay for express screening of potato transformants by GFP fluorescence // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. V. 73. P. 69. <https://doi.org/10.3103/s0096392518020086>
35. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERI285>
36. Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models // Trends Genet. 2004. V. 20. P. 375. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2004.06.004>
37. Cluster P.D., O'Dell M., Metzloff M., Flavell R.B. Details of T-DNA structural organization from a transgenic Petunia population exhibiting co-suppression // Plant Mol. Biol. 1996. V. 32. P. 1197. <https://doi.org/10.1007/BF00041406>
38. Escoubas J.M., Lomas M., LaRoche J., Falkowski P.G. Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1995. V. 92. P. 10237. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.22.10237>
39. Czajka K.M., Nkongolo K. Transcriptome analysis of trembling aspen (*Populus tremuloides*) under nickel stress // PLOS ONE. 2022. V. 17. P. e0274740. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0274740>
40. Daley M., Knauf V.C., Summerfelt K.R., Turner J.C. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants // Plant Cell Rep. 1998. V. 17. P. 489. <https://doi.org/10.1007/S002990050430>

УДК 581.1, 615.322

ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСА ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭНДЕМИКА ЯКУТИИ *DRACOCEPHALUM JACUTENSE* PESCHKOVA С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2023 г. Ж. М. Охлопкова^{a, *}, М. П. Разгонова^{b, d}, П. С. Егорова^e, К. С. Голохваст^{c, d, f}

^aФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова”, Якутск, Россия

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

^cФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Дальневосточный федеральный университет”, НОЦ нанотехнологии,
Политехнический институт, Владивосток, Россия

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

^eИнститут биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, Россия

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

*e-mail: zhm.okhlopkova@s-vfu.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 13.12.2022 г.

Змееголовник якутский (*Dracocephalum jacutense* Peschkova) — редкий и исчезающий вид рода *Dracocephalum* L. семейства губоцветных. Вид был впервые описан в 1997 г., занесен в Красную книгу Якутии (2017 г.). До настоящего времени в силу редкой встречаемости *D. jacutense* практически не проведены его фитохимические исследования и нет информации о содержании в этом растении биологически активных соединений (вторичных метаболитов). В настоящей работе с использованием метода tandem mass spectrometry осуществлено исследование комплекса полифенольных соединений в соцветиях змееголовника якутского, собранного в местах его первого обнаружения — Кобяйском районе Республики Саха (Якутия). В результате проведенного анализа в спиртовых экстрактах соцветий *Dracocephalum jacutense* было обнаружено 48 полифенольных соединений, среди которых идентифицировано 17 флавонов, 7 флавонолов, 3 флаван-3-олов, 12 фенолокислот, 1 лигнан, 2 кумарина, 6 антоцианидинов. Следует отметить, что из всех идентифицированных полифенолов более половины (30 соединений) для представителей рода *Dracocephalum* L. было обнаружено впервые. Полученные результаты свидетельствуют об уникальном составе полифенольных соединений в соцветиях *D. jacutense* Peschkova. С целью сохранения этого узлокального эндемика Восточной Сибири начаты работы по разработке эффективного метода его микроклонального размножения *in vitro*.

Ключевые слова: *Dracocephalum jacutense*, ВЭЖХ-МС/МС, tandem mass spectrometry, полифенольные соединения, CID-спектр

DOI: 10.31857/S0015330322600723, **EDN:** IBPENP

ВВЕДЕНИЕ

Одним из редких и исчезающих видов рода *Dracocephalum* L. (семейство *Lamiaceae*) является *Dracocephalum jacutense* Peschkova. Впервые растение было обнаружено в 1985 г. в окрестностях с. Сангар (Кобяйский район, Якутия) и описано как новый вид во “Флоре Сибири” в 1997 г. [1]. Исследования особенностей онтогенеза и изучения возрастного анализа ценопопуляций *D. jacutense* были на-

чаты лишь в 2010 г., в частности, было обнаружено всего 3 местонахождения в разнотравных степных сообществах на склоне коренного каменистого берега р. Лены [2] (рис. 1). *D. jacutense* занесен в Красную книгу Республики Саха (Якутия) [3]. Представители рода *Dracocephalum* L. представляют особый интерес в связи с содержанием в них вторичных метаболитов, таких как флавоноиды, терпеноиды, кумарины, дубильные вещества, гликозиды и др. [4–6]. Проведенные исследования

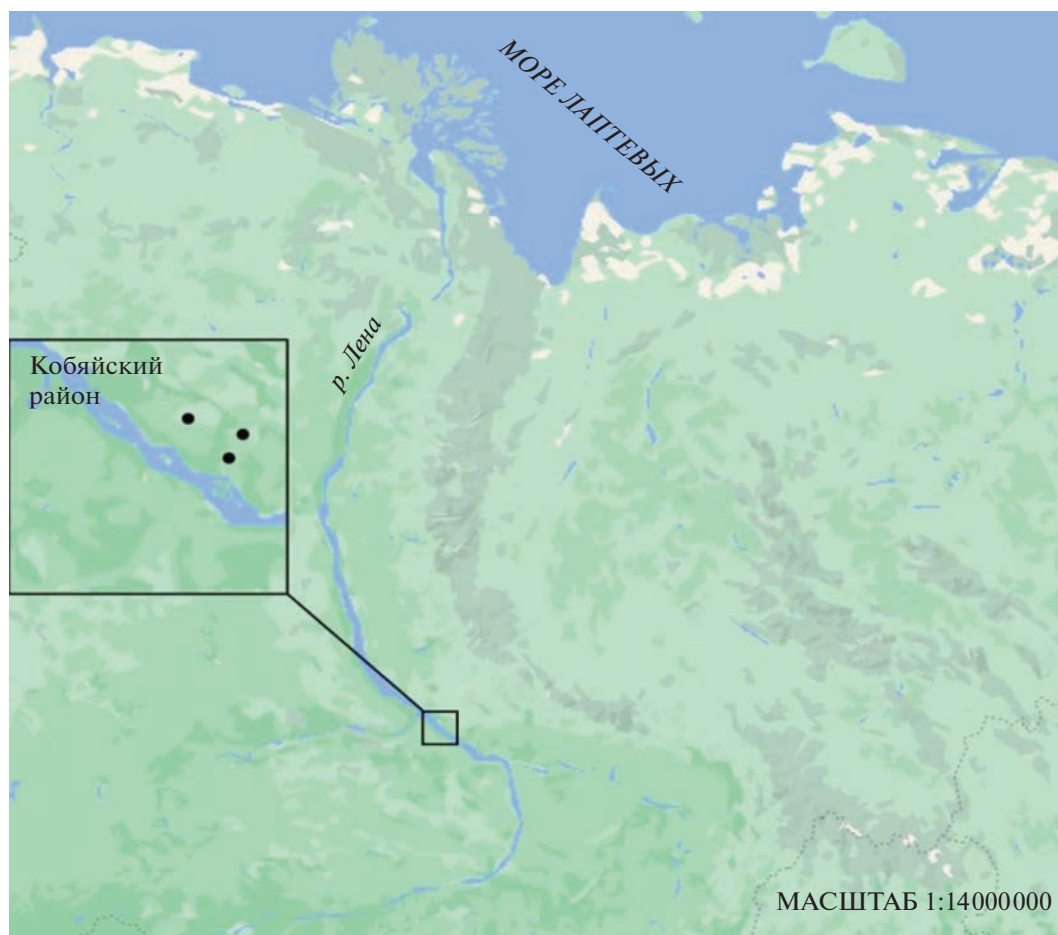


Рис. 1. Географическое местонахождение ценопопуляций *Dracosephalum jacutense* Peschkova.

биологической активности препаратов из *Dracosephalum spp.* показали антиоксидантные, антигипоксические, иммуномодулирующие, противораковые свойства экстрактов из фитомассы *Dracosephalum* [7, 8].

Dracosephalum jacutense Peschkova произрастает в одном из холодных регионов, в Якутии, которой присущи резко континентальный климат, сплошная многолетняя мерзлота, высокая солнечная инсоляция в короткий сухой летний период и почти 8-месячный зимний период. Растение постоянно испытывает различные виды стресса и может накапливать в своем составе интересные вторичные метаболиты.

В настоящей работе представлен метаболомный анализ полифенольного состава соцветий *D. jacutense* Peschkova, собранных в окрестностях с. Сангар (Кобяйского района, Якутии) в ходе экспедиции в июле 2022 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были использованы соцветия *D. jacutense* Peschkova, собранные в

окрестностях с. Сангар (Кобяйского района, Якутии) в ходе экспедиции в июле 2022 г. (63°53'52.5–72.8" N; 127°30'39.9–49" E).

Для получения высококонцентрированных экстрактов была применена дробная мацерация. При этом общее количество экстрагента (метилового спирта х.ч.) разделено на 3 части и последовательно использовано для настаивания соцветий *D. jacutense*, с первой частью, затем со второй и третьей. Время настойки каждой части экстрагента составляло 7 дней.

Для идентификации полифенольных соединений в экстрактах, полученных мацерационным методом, использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в комплексе с ионной ловушкой BRUKER DALTONIKS (тандемная масс-спектрометрия).

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Для выполнения разделения многокомпонентных смесей использовали жидкостный хроматограф высокого давления Shimadzu LC–20 Promi-

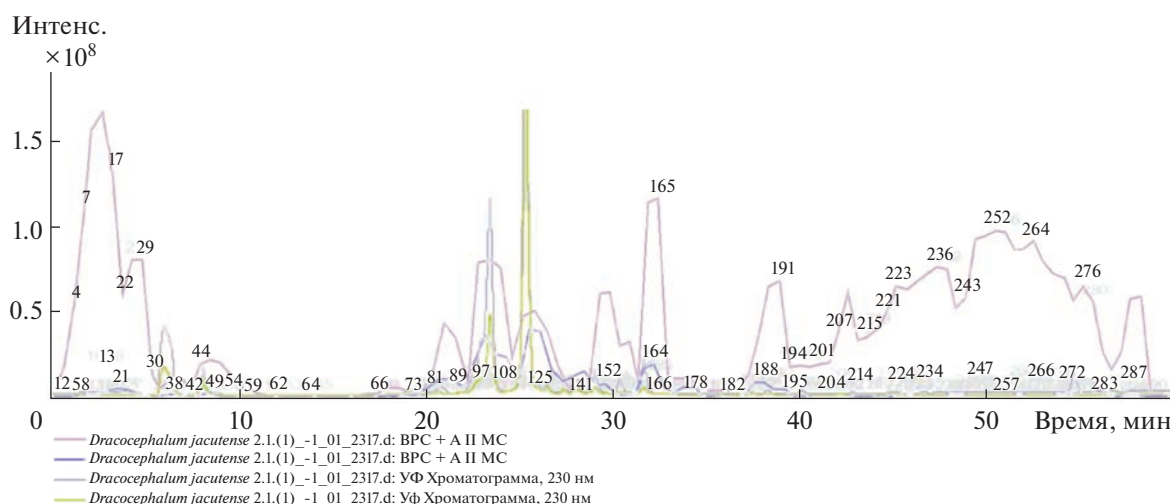


Рис. 2. Распределенный график тандемной масс-спектрометрии анализируемых целевых аналитов экстракта *D. jacutense* Peschkova, представленный ионной хроматограммой.

nence HPLC (Shimadzu, Япония), оборудованный UV-детектором и обратнофазной колонкой Shodex ODP-40 4E. Программа элюции градиента следующая: 0.0 – 4 мин, 100% CH_3CN ; 4 – 60 мин, 100% – 25% CH_3CN ; 60 – 75 мин, 25% – 0% CH_3CN ; контрольная промывка 75 – 120 мин 0% CH_3CN . Весь ВЭЖХ-анализ сделан с UV-VIS-детектором SPD-20A (Kanda-Nishikicho 1-chrome, Shimadzu, Chiyoda-ku, Токио, Япония) при длинах волн 230 и 330 нм; температуре 50°C. Объем впрыска составлял 1 мкл.

Тандемная масс-спектрометрия

Масс-спектрометрические данные получены с помощью ионной ловушки amaZon SL (производство фирмы “BRUKER DALTONIKS”, Германия), оснащенной источником ионизации с электрораспылением ESI 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 V, напряжение на изгибе торцевой пластины: 1500 V, фрагментатор: 280 V, энергия столкновения: 60 eV. Масс-спектрометр использовался в диапазоне сканирования m/z 100 – 1.700 для МС и МС/МС. Произведена фрагментация 4 порядка.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уточнение метаболомного состава — чрезвычайно важный результат в системе биохимического анализа. Распределенный график тандемной масс-спектрометрии анализируемых целе-

вых аналитов экстрактов *D. jacutense* Peschkova представлен на рис. 2.

Всего на ионных хроматограммах было обнаружено 300 пиков выделенных целевых аналитов. Для простоты идентификации составлена унифицированная системная таблица молекулярных масс целевых аналитов полифенольных соединений, выделенных из экстрактов соцветий *D. jacutense* (табл. 1).

В результате масс-спектрометрического исследования экстрактов из соцветий *D. jacutense* было определено 48 полифенольных соединений, из них 30 химических соединений были идентифицированы впервые в роду *Dracococephalum*. Идентификация соединений (значения m/z и фрагментированные ионы) производилась путем сравнения полученных экспериментальных данных с известными опубликованными научными масс-спектрометрическими результатами [9–13].

Наиболее характерные примеры CID-спектров (collision induced dissociation spectrum) ионных хроматограмм, полученных с помощью тандемной масс-спектрометрии представлены на рис. 3 и 4. CID-спектр кемпферола 3-*O*-рутинозида в режиме положительных ионов, полученный из экстракта *D. jacutense*, показан на рис. 3.

$[\text{M}+\text{H}]^+$ ион продуцирует два фрагментированных иона: m/z 287.21 и m/z 449.31 (рис. 3). Фрагментированный ион m/z 287.21 формирует три характерных дочерних иона (m/z 213.2; m/z 185.24; m/z 137.24). В приведенных статьях по масс-спектрометрии в экстрактах растений *Dracococephalum* [6, 7], *Lonicera japonica* [9], *Rhus coriaria* [11] это соединение классифицируется как флавонол кемпферол 3-*O*-рутинозид. CID-спектр полифенольной хлорогеновой кислоты в режиме по-

Таблица 1. Полифенольные соединения, идентифицированные методом тандемной масс-спектрометрии в экстракте соцветий *D. jacutense*

№	Класс химического соединения	Идентифицированное соединение	Химическая формула	Ион-аддукт [M-H] ⁻	Ион-аддукт [M+H] ⁺	Фрагментация МС/МС 1 порядка	Фрагментация МС/МС 2 порядка	Фрагментация МС/МС 3 порядка	Источники
1	Флаван	Апигенин	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		269	225	181	117	<i>Dracocephalum palmatum</i> [4, 5]; <i>Dracocephalum</i> [6, 7]; <i>Lonicera japonicum</i> [9]; Andean blueberry [10]
2	Флаван	Генкванин	C ₁₆ H ₁₂ O ₅		285	165			<i>Dracocephalum palmatum</i> [4, 5]; <i>Rosmarinus officinalis</i> [12]; <i>Mentha</i> [13]
3	Флаван	Хризоэриол	C ₁₆ H ₁₂ O ₆		301	286; 167	258	203	<i>Dracocephalum palmatum</i> [4, 5]; <i>Rhus coriaria</i> [11]; Propolis [14]
4	Флаван	Гомоэриодиктиол*	C ₁₆ H ₁₄ O ₆		303	285; 177	163	145	<i>Mentha</i> [13]
5	Флаван	Дигидроксидиметокси (изо)флаван*	C ₁₇ H ₁₄ O ₆		315	300; 272	272	257; 243; 217; 201; 185; 167	<i>Rosmarinus officinalis</i> [12]; Propolis [14]; <i>Astragali radix</i> [15]
6	Флаван	5,7-Диметоксилютеолин*	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313		285; 213; 185	185; 145		<i>Syzygium aromaticum</i> [16]; <i>Rosa rugosa</i> [17]
7	Флаван	Цирсиллол*	C ₁₇ H ₁₄ O ₇		331	316; 298; 233; 157	297; 187; 134		<i>Ocimum</i> [18]
8	Флаван	Диметокси-тригидрокси (изо)флаван*	C ₁₇ H ₁₄ O ₇		331	316; 226	298; 226	270; 226	Propolis [14]; <i>Jatropha</i> [19]
9	Флаван	Апигенин <i>O</i> -тексозид	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431		269	269; 225; 149	224; 157	<i>Dracocephalum palmatum</i> [4, 5]; <i>F. glaucescens</i> ; <i>F. potsii</i> [19]
10	Флаван	Апигенин-7- <i>O</i> -глюкозид	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀		433	271	153		<i>Dracocephalum palmatum</i> [4, 5]; <i>Dracocephalum</i> [6, 7]
11	Флаван	Апигенин 7- <i>O</i> -глюкоронид	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁		447	271	153	271; 171	<i>Dracocephalum</i> [6, 7]; <i>Perilla frutescens</i> [20]; <i>Eucalyptus Globulus</i> [21]; Bougainvillea [22]

Таблица 1. Продолжение

№	Класс химического соединения	Идентифицированное соединение	Химическая формула	Ион-аддукт [M-H] ⁻	Ион-аддукт [M+H] ⁺	Фрагментация МС/МС 1 порядка	Фрагментация МС/МС 2 порядка	Фрагментация МС/МС 3 порядка	Источники
12	Флаван	Акацетин 7- <i>O</i> -глюкозид	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀		447	285; 149	270	242	<i>Dracocephalum palmatum</i> [4, 5]; <i>Dracocephalum</i> [6, 7]; <i>Bougainvillea</i> [22]
13	Флаван	6,4'-Диметоксиизофлаво-7- <i>O</i> -глюкозид*	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀		461	285	270; 242; 153	242	<i>Astragali radix</i> [15]
14	Флаван	Апигенин- <i>O</i> -рамнозид*	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁		463	273; 153	153; 171	171	<i>Passion fruit</i> [23]
15	Флаван	Хризеоэриол-7- <i>O</i> -глюкуронид*	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂		477	301	286	258	Propolis [14]
16	Изофлаван	Апигенин 7- <i>O</i> - <i>beta</i> - <i>D</i> -(6"- <i>O</i> -малонил)-глюкозид	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃		519	184; 500; 466; 371; 258	125		<i>Dracocephalum</i> [6, 7]; <i>Zostera marina</i> [24]
17	Флаван	Хризеоэриол <i>O</i> -гексозид <i>C</i> -гексозид*	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆		625	445; 463; 377; 347	357; 217		<i>Triticum aestivum</i> L. [25]
18	Флавонол	Изорамнетин*	C ₁₆ H ₁₂ O ₇		317	299; 257; 214; 173	281; 188		<i>Rosmarinus officinalis</i> [12]; Propolis [14]; Andean blueberry [10]
19	Флавоноид	3,5 - Диацетилтамбулин*	C ₂₂ H ₂₀ O ₉	427		381; 249	249; 161	161; 124	<i>A. cordifolia</i> [19]
20	Флавонол	Кемпферол-3- <i>O</i> -глюкуронид	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂		463	287	268; 169	241; 119	<i>Dracocephalum</i> [6, 7]; <i>A. cordifolia</i> ; <i>G. linguiforme</i> [19]; <i>Rhus coriaria</i> [11]; Strawberry [23]
21	Флавонол	Таксифолин-3- <i>O</i> -гексозид*	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂		467	305; 259; 195; 153	259; 195; 153	231; 149	Andean blueberry [10]; millet grains [26]
22	Флавонол	Кемпферол 3- <i>O</i> -рутинозид	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅		595	287; 345; 389; 449	287; 245; 153	171	<i>Dracocephalum</i> [4, 5]; <i>Lonicera japonica</i> [9]; <i>Rhus coriaria</i> [11]

Таблица 1. Продолжение

№	Класс химического соединения	Идентифицированное соединение	Химическая формула	Ион-аддукт [M-H] ⁻	Ион-аддукт [M+H] ⁺	Фрагментация МС/МС 1 порядка	Фрагментация МС/МС 2 порядка	Фрагментация МС/МС 3 порядка	Источники
23	Флавонол	Кемпферол-3,7-ди- <i>O</i> -глюкозид*	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆		611	287; 449	287; 213; 185; 137	185; 157	Rapeseed petals [27]
24	Флавонол	Кемпферолдигексозидрамнозид*	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀		757	595; 287	287; 213; 137	185; 168	<i>C. edulis</i> [19]
25	Флаван-3-ол	Епиафзелехин*	C ₁₅ H ₁₄ O ₅		275	228; 210; 175; 157; 132	212; 203; 183; 170	194	<i>A. cordifolia</i> ; <i>F. glaucescens</i> ; <i>F. herrenae</i> [19]; <i>Cassia abbreviata</i> [28]
26	Флаван-3-ол	Катехин	C ₁₅ H ₁₄ O ₆		291	207; 123	123		<i>Camellia kucha</i> [29]; Actinidia [30]
27	Флаван-3-ол	Эпигаллокатехин-3-галлат*	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁		459	290; 207	207; 123		<i>F. glaucescens</i> [19]; <i>Camellia kucha</i> [29]
28	Полифенольная кислота	<i>n</i> -Кумаровая кислота	C ₉ H ₈ O ₃		165	147	119		Rapeseed petals [27]; <i>F. pottii</i> [19]; <i>Rhus coriaria</i> [11]; Andean blueberry [10]
29	Полифенольная кислота	3,4-Дигидроксикоричная кислота*	C ₉ H ₁₀ O ₄		183	137			Eucalyptus Globulus [21]
30	Полифенольная кислота	Сальвиановая кислота А*	C ₉ H ₁₀ O ₅	197		179; 135	135		Huolisu Oral Liquid [31]
31	Полифенольная кислота	Гексозид протокатеховой кислоты*	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315		153; 123	123		<i>Rhus coriaria</i> [13]; <i>Eucalyptus Globulus</i> [21]
32	Полифенольная кислота	Сальвианоловая кислота G	C ₁₈ H ₁₂ O ₇		341	296; 208	278; 208	235; 164	<i>Dracosephalum</i> [6, 7]
33	Полифенольная кислота	Гексозид кофейной кислоты	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341		179; 119	143; 131		<i>Dracosephalum</i> [6, 7]; <i>Cherimoya</i> , <i>papaya</i> [23]
34	Полифенольная кислота	Хлорогеновая кислота	C ₁₆ H ₁₈ O ₉		355	179; 338; 227	127		<i>Dracosephalum palmatum</i> [4, 5]; Rapeseed petals [27]; <i>Lonicera japonicum</i> [9]; <i>Rhus coriaria</i> [11]; Andean blueberry [10]

Таблица 1. Окончание

№	Класс химического соединения	Идентифицированное соединение	Химическая формула	Ион-аддукт [M-H] ⁻	Ион-аддукт [M+H] ⁺	Фрагментация МС/МС 1 порядка	Фрагментация МС/МС 2 порядка	Фрагментация МС/МС 3 порядка	Источники
35	Полифенольная кислота	Изохлорогеновая кислота	C ₁₆ H ₁₈ O ₉		355	323; 269; 165	295; 208; 133	295; 249; 221	Actinidia [30]
36	Полифенольная кислота	1/3/4/5- <i>n</i> -Кумарилхи- ниновая кислота*	C ₁₈ H ₂₀ O ₉		381	321; 275; 233	260; 218; 143		Actinidia [30]
37	Полифенольная кислота	8,8'-Арил-диферуло- вая кислота*	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	385		193; 285	193; 161		millet grains [26]
38	Полифенольная кислота	Гексозид кофейной кислоты димер*	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₇	683		341	179; 161	143	Strawberry, Lemon, Cheri- moya, Passion fruit [23]
39	Полифенольная кислота	Клеродендрановая кислота Н*	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₆	719		359	161		Lepchinia [32]
40	Лигнан	Филлигенин*	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	371		163; 325	119		Lignans [33]
41	Гидроксикумарин	Умбеллиферон*	C ₉ H ₆ O ₃		163	145; 135; 117	117		<i>F. glaucescens</i> [19]; <i>Zostera marina</i> [24]; Actinidia [30]
42	Гидроксикумарин	Умбеллиферон гексозид*	C ₁₅ H ₁₆ O ₈		325	307; 288; 271; 253; 241	127; 118		<i>G. linguiforme</i> [19]
43	Антоцианидин	Петунидин	C ₁₆ H ₁₃ O ₇₊		318	166; 300	121		<i>Dracocepalum</i> [6, 7]; <i>A. cordifolia</i> ; <i>C. edulis</i> [19]
44	Антоцианидин	Пеларгонидин-3- <i>O</i> - глюкозид	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀		433	271	153; 225	171	<i>Dracocepalum</i> [6, 7]
45	Антоцианидин	Цианидин 3,5- <i>O</i> - диклокозид*	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆		611	287; 449	287; 241; 213; 175; 149	213; 185; 172; 157; 145	Rapeseed petals [27]
46	Антоцианидин	Цианидин-3- <i>O</i> -рути- нозид-5- <i>O</i> -глюкозид*	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀		757	287; 449; 595	287; 213; 137	185	<i>Camellia kucha</i> [29]
47	Антоцианидин	Дельфинидин 3- <i>O</i> - рутинозид-5- <i>O</i> -глюко- зид*	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₁		773	303; 465; 611	257; 303; 229; 165	257; 229; 201; 116	<i>Berberis microphylla</i> [34]
48	Антоцианидин	Малонил-шисонин*	C ₃₉ H ₃₉ O ₂₁₊		843	595; 535; 491; 287	287; 259; 213; 147	213; 185	<i>Perilla frutescens</i> [20]

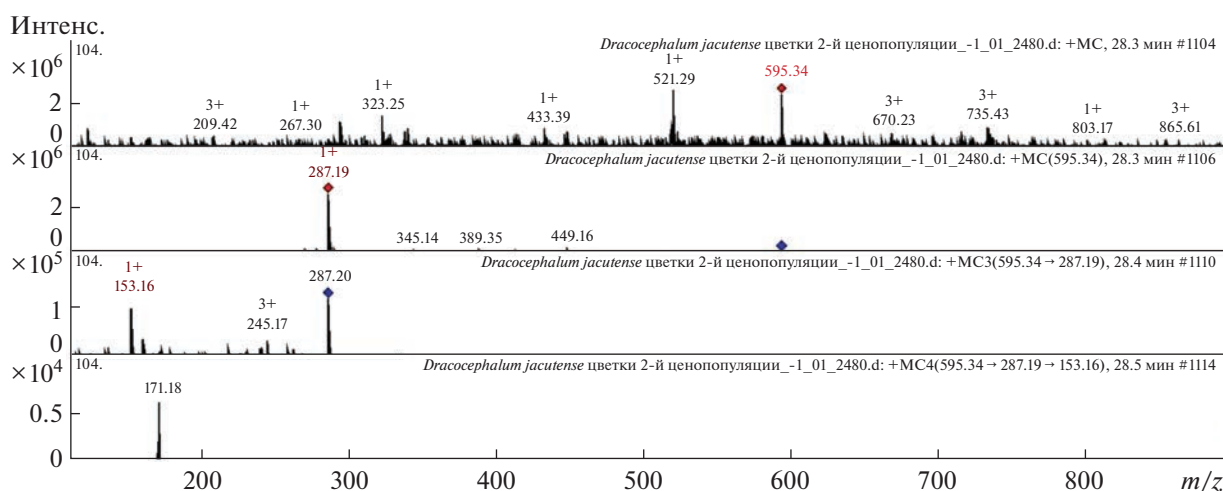


Рис. 3. CID-спектр соединения кемпферола 3-*O*-рутинозида, полученный из экстракта *D. jacutense*, m/z 611.41.

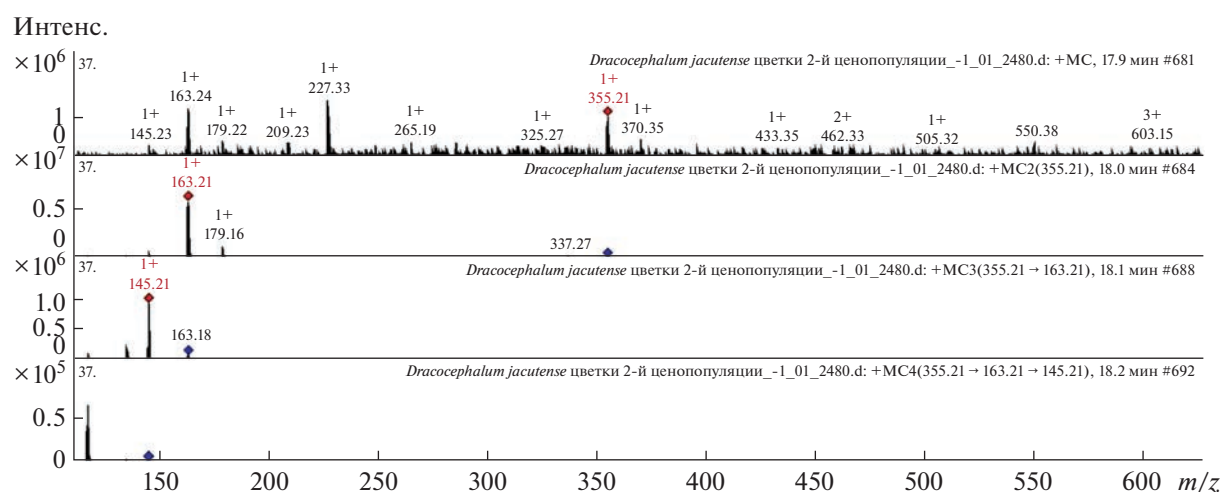


Рис. 4. CID-спектр хлорогеновой кислоты, полученный из экстракта *D. jacutense*, m/z 355.21.

ложительных ионов, полученный из экстракта *D. jacutense*, показан на рис. 4.

$[M+H]^+$ ион продуцирует два фрагментированных иона, m/z 163.21 и m/z 179.16 (рис. 4). Фрагментированный ион с m/z 163.21 формирует один дочерний ион с m/z 145.21. В нижеприведенных научных статьях данное соединение идентифицируется, как хлорогеновая кислота: *Dracocephalum palmatum* [6, 7], *Lonicera japonica* [9], *Andean blueberry* [10], *Rhus coriaria* [11].

ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракты *D. jacutense* содержат большое количество полифенольных комплексов, являющихся биологически активными соединениями. Для наиболее полного и безопасного экстрагирования был использован метод мацерации с помощью MeOH. Для идентификации целевых аналитов в экстрактах использована ВЭЖХ в комплексе с ион-

ной ловушкой BRUKER DALTONIKS. Результаты предварительного исследования показали присутствие 48 фенольных соединений в экстрактах соцветий, из них 30 соединений идентифицировано впервые в роду *Dracocephalum*. Это флавоны: 5,7-диметоксилютеолин, диметокси-тригидрокси(изо)флавоны, хризоэриол-7-*O*-глюкуронид, апигенин-*O*-рамнозид, хризоэриол-*O*-гексозид, С-гексозид, изорамнетин; флавонолы таксифолин-3-*O*-гексозид, кемпферол-3,7-ди-*O*-глюкозид, кемпферол дигексозид, рамнозид, антоцианы цианидин 3,5-*O*-диглюкозид, дельфинидин 3-*O*-рутинозид-5-*O*-глюкозид, лигнан филлигенин и др.

Ранее нами было проведено исследование по скринингу полифенольных составов *Dracocephalum ruyschiana* и *Dracocephalum palmatum* методами tandemной масс-спектрометрии [6, 7]. При сравнении трех видов рода *Dracocephalum* выявились 18 полифенольных соединений, присутствующих

в трех нами исследованных видах *Dracocephalum*. Это флавоны апигенин, хризоеириол, генкванин, апигенин 7-*O*-глюкозид, апигенин 7-*O*-глюкоронид, флавонолы кемпферол 3-*O*-глюкоронид, кемпферол 3-*O*-рутинозид, *n*-кумаровая кислота, сальвианоловая кислота G, гексозид кофейной кислоты, хлорогеновая кислота и т.д.

Полученные данные важны для разработки и производства различных составов биологически активных добавок и функциональных продуктов, содержащих целевые экстракты *D. jacutense*. Большое разнообразие биологически активных полифенольных соединений открывает богатые возможности для создания и новых лекарственных препаратов, на основе экстрактов из семейства *Dracocephalum*, и дальнейших исследований по функциональному и специализированному питанию, использующих в своей основе натуральные экстракты растений.

Исследование выполнено в Северо-Восточном федеральном университете за счет гранта Российского научного фонда №22–14–20031, <https://rscf.ru/project/22-14-20031/> и гранта Якутского научного фонда на основании Соглашения №194-06_22Д.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пешкова Г.А. *Dracocephalum* L. // Флора Сибири. Т. 11. Новосибирск: Наука, 1997. С. 170.
2. Денисова Г.Р., Николин Е.Г. Онтогенез и возрастной анализ ценопопуляций узколокального эндемика Якутии *Dracocephalum jacutense* (Lamiaceae) // Ботанический журнал. 2012. Т. 97. № 3. С. 365.
3. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Н.С. Данилова. Москва: Изд-во "Репарт". 2017. 412 с.
4. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Okhlopova Z.M., Zulfugarov I.S. Chemical composition and antioxidant activity of *tánara ótó* (*Dracocephalum palmatum* Stephan), a medicinal plant used by the North-Yakutian nomads // *Molecules*. 2013. V. 18. P. 14105. <https://doi.org/10.3390/molecules181114105>
5. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Kim E., Kim S.W., Zulfugarov I.S. New glycosides of eriodictyol from *Dracocephalum palmatum* // *Chem. Nat. Compd.* 2018. V. 54. P. 860. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2499-4>
6. Razgonova M.P., Okhlopova Z.M., Golokhvast K.S. Research of *Dracocephalum palmatum* S. and *Dracocephalum ruyschiana* L. originating from Yakutia and identification of metabolites by tandem mass spectrometry // *BIO Web of Conferences*. 2022. V. 43. P. 01010. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20224301010>
7. Okhlopova Zh.M., Razgonova M.P., Pikula K.S., Zakharenko A.M., Piekoszewski W., Manakov Y.A., Er-cisli S., Golokhvast K.S. *Dracocephalum palmatum* S. and *Dracocephalum ruyschiana* L. originating from Yakutia: a high-resolution mass spectrometric approach for the comprehensive characterization of phenolic compounds // *Applied Sci.* 2022. V. 12. P. 1766. <https://doi.org/10.3390/app12031766>
8. Lee S.-E., Okhlopova Z., Lim C., Cho S. *Dracocephalum palmatum* Stephan extract induces apoptosis in human prostate cancer cells via the caspase-8-mediated extrinsic pathway // *Chinese J. Nat. Med.* 2020. V. 18. P. 793. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)60019-X](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(20)60019-X)
9. 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>
10. Aita S.E., Capriotti A.L., Cavaliere C., Cerrato A., Giannelli Moneta B., Montone C.M., Piovesana S., Lagana A. Andean blueberry of the genus *disterigma*: a high-resolution mass spectrometric approach for the comprehensive characterization of phenolic compounds // *Separations*. 2021. V. 8. P. 58. <https://doi.org/10.3390/separations8050058>
11. Abu-Reidah I.M., Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Araes-Roman D., Segura-Carretero A. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits // *Food Chem.* 2015. V. 166. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>
12. Mena P., Cirlini M., Tassotti M., Herrlinger K.A., Dall'Asta C., Del Rio D. Phytochemical profiling of flavonoids, phenolic acids, terpenoids, and volatile fraction of a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract // *Molecules*. 2016. V. 21. P. 1576. <https://doi.org/10.3390/molecules21111576>
13. 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>
14. Belmehdi O., Bouyahya A., Jeko J., Cziaky Z., Zengin G., Sotkó G., El Baaboua A., Senhaji N.S., Abrini 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>
15. Zhang J., Xu X.-J., Xu W., Huang J., Zhu D., Qui X.-H. Rapid characterization and identification of flavonoids in *Radix Astragali* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry // *J. Chromatogr. Sci.* 2015. V. 53. P. 945. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu155>
16. Fanthoni A., Saepudin E., Cahyana A.H., Rahayu D.U.C., Haib J. Identification of nonvolatile compounds in clove (*Syzygium aromaticum*) from manado // *International symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences*. 2017. V. 1862. P. 030079-1. <https://doi.org/10.1063/1.4991183>
17. Razgonova M.P., Bazhenova B.B., Zabalueva Y.Y., Burkhanova A.G., Zakharenko A.M., Kupriyanov A.N.,

- Sabitov A.S., Ercisli S., Golokhvast K.S. Rosa davurica* Pall., *Rosa rugosa* Thumb., and *Rosa acicularis* Lindl. originating from far eastern Russia: Screening of 146 chemical constituents in tree species of the genus *Rosa* // *Applied Sci.* 2022. V. 12. P. 9401.
<https://doi.org/10.3390/app12199401>
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. Liq. Chromatogr. & Related Tech.* 2016. V. 39. P. 225.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1148048>
 19. Hamed A.R., El-Hawary S.S., Ibrahim R.M., Abdel-mohsen 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>
 20. He Y.-K., Yao Y.-Y., Chang Y.-N. Characterization of anthocyanins in *Perilla frutescens* var. *acuta* extract by advanced UPLC–ESI–IT–TOF–MSn method and their anticancer bioactivity // *Molecules.* 2015. V. 20. P. 9155.
<https://doi.org/10.3390/molecules20059155>
 21. 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 compounds in eucalyptus globulus leaves // *Int. J. Molec. Sci.* 2019. V. 20. P. 3875.
<https://doi.org/10.3390/ijms20163875>
 22. El-Sayed M.A., Abbas F.A., Refaat S., El-Shafae A.M., Fikry E. UPLC–ESI–MS/MS profile of the ethyl acetate fraction of aerial parts of bougainvillea 'Scarlett O'Hara' cultivated in Egypt // *Egyptian J. Chem.* 2021. V. 64. P. 22.
<https://doi.org/10.21608/ejchem.2020.45694.2933>
 23. Spinola V., Pinto J., Castilho P.C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC–DAD–ESI–MSn and screening for their antioxidant activity // *Food Chem.* 2015. V. 173. P. 14.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.163>
 24. 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>
 25. Cavaliere C., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Laganà A. Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2005. V. 19. P. 3143.
<https://doi.org/10.1002/rcm.2185>
 26. Chandrasekara A., Shahidi F. Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC–DAD–ESI–MSn // *J. Functional Foods.* 2011. V. 3. P. 144.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.007>
 27. Yin N.-W., Wang S.-X., Jia L.-D., Zhu M.-C., Yang J., Zhou B.-J., Yin J.-M., Lu K., Wang R., Li J.-N., Qu C.-M. Identification and characterization of major constituents in different-colored rapeseed petals by UPLC–HESI–MS/MS // *Agricult. Food Chem.* 2019. V. 67. P. 11053.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05046>
 28. Sobeh M., Mahmoud M.F., Abdelfattah M.A.O., Cheng H., El-Shazly A.M., Wink M. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities *in vivo* // *J. Ethnopharmacol.* 2018. V. 213. P. 38.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.007>
 29. 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>
 30. Qin D., Wang Q., Li H., Jiang X., Fang K., Wang Q., Li B., Pan C., Wu H. Chemical constituents of radix *Actinidia chinensis* plant by UPLC–QTOF–MS // *Biomedical Chromatography.* Wiley. 2021. e5103.
<https://doi.org/10.1002/bmc.5103>
 31. 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 huolisu oral liquid based on serum analysis and network analysis // *Frontiers in Pharma.* 2021. V. 12. P. 710976.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.710976>
 32. Serrano C.A., Villena G.K., Rodriguez E.F. Phytochemical profile and rosmarinic acid purification from two Peruvian *Lepechinia* Willd. species (Salviinae, Mentheae, Lamiaceae) // *Sci. Reports.* 2021. V. 11. P. 7260.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-86692-3>
 33. 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 Spectr.* 2008. V. 43. P. 97.
<https://doi.org/10.1002/jms.1276>
 34. Ruiz A., Hermosín-Gutiérrez I., Vergara C., von Baer D., Zapata M., Hitschfeld A., Obando L., Mardones C. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC–DAD–ESI–MS/MS // *Food Res. Int.* 2013. V. 51. P. 706.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.043>