ISSN 0015-3303

Том 70, Номер 4 Июль - Август 2023

ЖУРНАЛ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

www.sciencejournals.ru

300 лет Российская Академия Наук

СОДЕРЖАНИЕ

Том 70, номер 4, 2023

ОБЗОРЫ

Использование наноматериалов как стратегия защиты растений от действия неблагоприятных температур

Ю. В. Венжик, А. Н. Дерябин 339

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Дифференциальный профиль экспрессии генов унипортеров сахаров семейства *SWEET* в регуляции качественных признаков плода у видов томата (*Solanum* секция Lycopersicon)

М. А. Филюшин, М. А. Слугина, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева 354

Изоляция *CP-PVY*-специфичных *siRNA* из *PVY*-инфицированных растений *Solanum tuberosum*

М. Ю. Сутула, Ж. К. Кабатаева, Г. К. Комекова, Т. С. Хоснутдинова, Е. А. Жакманова 365

Ca^{2+}-зависимая регуляция протонной проницаемости внутренней мембраны митохондрий семядолей люпина

А. Г. Шугаев, П. А. Буцанец, Н. А. Шугаева 372

Белок мембранных нанодоменов Flot1 участвует в образовании ранних эндосом в клетках корней *A. thaliana*

Л. А. Халилова, А. С. Воронков 382

Особенности роста и содержания инулина в каллусных культурах *Cichorium intybus* L. *in vitro*

Е. А. Калашникова, Р. Н. Киракосян, В. И. Трухачев, М. Г. Панкова, А. В. Сумин 392

Кратковременные ежесуточные понижения температуры могут нивелировать негативный эффект круглосуточного освещения на фотосинтетический аппарат растений

Е. Н. Икконен, Т. Г. Шибаева, Е. Г. Шерудило, А. Ф. Титов 402

Влияние ионов меди на рост культуры клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.)

Е. А. Осипова 410

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Способы культивирования *Arabidopsis thaliana* в лабораторных условиях

В. А. Фридман, В. С. Фадеев, А. А. Тюрин, И. С. Демьянчук, И. В. Голденкова-Павлова 417

ЛЕКЦИИ В ЖУРНАЛЕ

Клеточный цикл растений: молекулярные события, регуляция внешними факторами и фитогормонами

А. В. Носов, А. А. Фоменков 433

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 339–353

ОБЗОРЫ

УДК 581.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ КАК СТРАТЕГИЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ ДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ТЕМПЕРАТУР

© 2023 г. Ю. В. Венжик[a], *, А. Н. Дерябин[a]

[a] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 02.02.2023 г.
После доработки 03.02.2023 г.
Принята к публикации 03.02.2023 г.

В условиях эскалации климатических угроз во всем мире растет необходимость разработки новых стратегий повышения стрессоустойчивости растений. Инновационные подходы в этом направлении предоставляют нанотехнологии, обеспечивающие производство разнообразных наноматериалов (НМ). К ним относят структуры размером менее 100 нм, обладающие уникальными физическими и химическими свойствами. Благодаря этому НМ способны проникать через биологические барьеры и накапливаться в клетках растений. Эффекты НМ на растительный организм могут быть как позитивными, так и негативными в зависимости от химической природы, размеров и концентраций НМ, объекта исследования и условий среды. Многие НМ в определенной концентрации способны регулировать практически все процессы в растительном организме: рост, водный обмен, активность фотосинтетического аппарата и про-/антиоксидантный баланс. Это позволяет предполагать возможность использования некоторых НМ как адаптогенов, усиливающих стрессоустойчивость растений. В настоящем обзоре представлен сравнительный анализ экспериментальных данных об использовании НМ в физиологии растений и сельском хозяйстве для защиты растений от действия неблагоприятных низких и высоких температур. Обсуждаются возможные механизмы действия НМ на растения, а также стратегия их дальнейшего использования в фундаментальной науке и сельском хозяйстве.

Ключевые слова: адаптация, высшие растения, наноматериалы, неблагоприятные температуры, стрессоустойчивость

DOI: 10.31857/S0015330323600080, **EDN:** QASNKT

ВВЕДЕНИЕ

Проблемы глобального роста населения, эскалации климатических угроз и связанного с этим сокращения пахотных земель во всем мире влекут необходимость разработки новых стратегий, направленных на повышение урожайности растений. Бóльшая часть территории Российской Федерации находится в зоне рискованного земледелия с неустойчивыми климатическими условиями, в которых перепады температур могут быть достаточно резкими. Причем как низкая, так и высокая температуры за пределами оптимальных значений создают существенные сельскохозяйственные риски. В условиях глобального потепления климата даже незначительное повышение среднегодовой температуры приводит к потерям урожая, которые по прогнозам ученых в ближайшее десятилетие вырастут на 40% [1]. Кроме того, для большинства растений, использующихся в сельском хозяйстве, снижение температуры выращивания ниже 10–15°C является критическим [2]. Именно поэтому повышение устойчивости сельскохозяйственных культур к неблагоприятным температурам – это не только актуальная проблема современной науки, но и ключевой путь к сокращению потерь сельскохозяйственной продукции и повышению эффективности растениеводства. В связи с этим, особую важность приобретает вопрос применения искусственных соединений, способных в низких концентрациях защищать растения в условиях действия неблагоприятных температур с минимальными рисками для окружающей среды и здоровья людей. В этом плане инновационные подходы к повышению стрессоустойчивости растений предоставляют нанотехнологии, обеспечивающие производство и внедрение в жизнь людей различных наноматериалов (НМ).

Сокращения: АОС – антиоксидантная система, НМ – наноматериалы, НЧ – наночастицы, ППР – поверхностный плазмонный резонанс, ФСА – фотосинтетический аппарат.

Изучение взаимодействия растений и НМ началось сравнительно недавно, однако к настоящему моменту накоплен достаточно обширный экспериментальной материал. Показано, что влияние НМ на растения может носить как позитивный, так и негативный характер [3–5]. НМ способны изменять практически все процессы в растительном организме – стимулировать или угнетать рост, фотосинтез, водный обмен, влиять на про-/антиоксидантный баланс, структуру органелл и экспрессию генов [5, 6]. При этом эффекты НМ зависят от целого ряда факторов, прежде всего, химической природы и размеров НМ, а также концентрации коллоидных растворов, используемых при работе с растительными объектами. Большую роль играют условия среды, в которых происходит взаимодействие НМ и растений. Как показывают исследования, под влиянием неблагоприятных абиотических факторов многие НМ способны повысить стрессоустойчивость растений. Например, обработка растений подсолнечника, риса и пшеницы коллоидными растворами наночастиц (НЧ) оксидов железа или цинка снижала окислительный стресс, вызванный тяжелыми металлами [7–9]. В экспериментах на пшенице, томате и люпине установлено, что НЧ серебра и оксида цинка повышали солеустойчивость [10, 11] и регулировали экспрессию генов стрессового ответа при солевом стрессе [12]. Карбоновые нанотрубки изменяли экспрессию генов, кодирующих белки водных каналов и участвующих в клеточном делении, индуцируя перенос воды, ионов кальция и железа, усиливая рост корней и накопление биомассы, а также стрессоустойчивость растений [13, 14]. Учитывая изложенные выше риски климатических угроз и связанные с ними сельскохозяйственные потери, особый интерес представляет вопрос об участии НМ в формировании повышенной устойчивости растений к неблагоприятным температурам. В данном обзоре проведена систематизация имеющихся в научной литературе данных об использовании НМ для защиты высших растений в условиях действия неблагоприятных низких и высоких температур.

НАНОМАТЕРИАЛЫ: СВОЙСТВА, ПРОИСХОЖДЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

К НМ, как правило, относят структуры, размеры которых не превышают 100 нм, обладающие необычными физико-химическими свойствами [15]. Малые размеры и большая площадь поверхности позволяют НМ проникать в клетки и органеллы растений, распространяться по тканям и аккумулироваться в них [6]. Для НМ характерна высокая физическая и химическая активность, благодаря чему некоторые из них обладают каталитическими свойствами [5]. Наличие уникальных оптических свойств, связанных с возбуждением локализованных плазмонных резонансов при взаимодействии со светом, обусловливает возможность многих НМ влиять на фотосинтетический аппарат (ФСА) растений – увеличивать скорость электронного транспорта, фотофосфорилирования и выхода кислорода [4, 16]. С другой стороны, НМ способны выступать в качестве протекторов окислительного стресса и фотоингибирования, играя роль “наноэнзимов” [17].

НМ могут иметь как природное (естественное), так и техногенное (искусственное) происхождение. В природе источниками НМ являются вулканы, лесные пожары и пыльные бури [5]. Огромное количество НМ создается искусственно для целей науки и промышленности. Существуют разные классификации искусственных НМ, основанные на их химической природе, структуре или способе получения. Чаще всего НМ делят на группы в зависимости от химической основы. Например, выделяют НМ на основе металлов (металлические), НМ на основе полуметаллов и неметаллов, отдельно выделяют углеродсодержащие нанотрубки, а также композитные (составные) НМ, объединяющие несколько разных элементов [5, 15]. По структуре НМ делят на НЧ, нанопленки (нанослои) и объемные наноструктуры [15].

Методы получения НМ обычно разделяют на две большие группы. К первой группе относят дисперсионные методы, основанные на диспергировании (измельчении) веществ различными способами – механическим, с помощью лазера, облучения и т. д. Вторая группа включает конденсационные методы, где НМ восстанавливаются из ионов солей [18]. К этой группе относят также биологический синтез НМ с помощью растений или микроорганизмов [5].

Темпы производства НМ неуклонно растут, и по оценкам ученых мировое потребление НМ уже в 2019 году достигло 600000 тонн в год [19]. При этом риски от попадания НМ в природную среду до сих пор не ясны, что вызывает оправданные сомнения исследователей. Возможно поэтому, НМ считают одними из самых изучаемых материалов сегодняшнего столетия [6]. Во всем мире НМ используются в биологии, химии и физике, а также медицине, сельском хозяйстве, косметологии и электронике. В научную терминологию уже прочно вошли термины “нанофермерство” и “нанобионические подходы”. Разработки последних лет свидетельствуют о возможности использования НМ для профилактики и лечения онкологических заболеваний, а также в пищевой промышленности, например, для очистки воды и пищевых продуктов [5, 20]. Все это позволяет с большой надеждой смотреть на использование НМ в науке и сельском хозяйстве в качестве стратегии для защиты растений в условиях изменяющегося климата.

ВЛИЯНИЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА РАСТЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Для большинства растений колебания температуры в пределах от 0 до 15°C могут вызывать серьезные повреждения клеточных структур и функций, связанные, прежде всего, с дегидратацией клеток, окислительным стрессом и снижением текучести мембран [2]. Еще более значительное понижение температуры среды – ниже 0°C – могут перенести только некоторые морозостойкие растения (например, озимые злаки), поскольку отрицательные температуры необратимо повреждают клетки и органеллы вследствие образования в них кристаллов льда [21]. К тому же при охлаждении все метаболические процессы в растительном организме, включая рост и фотосинтез, существенно ингибируются. Поглощаемая в условиях охлаждения световая энергия становится избыточной, поскольку превосходит способность ФСА использовать ее для фиксации CO_2, а риски образования АФК многократно возрастают [21, 22]. Генерация АФК в клетках и тканях приводит к интенсификации процессов ПОЛ мембран, нарушениям структуры белков и нуклеиновых кислот [23]. Как правило, в этих условиях снижается текучесть клеточных мембран, что приводит к изменению их проницаемости, неконтролируемому выходу ионов из клеток и дегидратации тканей. К основным механизмам защиты растений от низкотемпературного стресса относят структурно-функциональную, физиолого-биохимическую и молекулярно-генетическую адаптивную реорганизацию клеток и органелл, включающую биохимическую перестройку мембран, а также активацию антиоксидантной системы (АОС) [22]. При этом полностью изменяется метаболизм растений [24], “включаются” гены холодового ответа [25], в клетках и тканях накапливаются белки, углеводы и аминокислоты, необходимые для холодовой адаптации [26]. Растения отличаются по своей чувствительности к низким температурам. Для холодоустойчивых растений (пшеница, ячмень, картофель, горох, морковь и др.) диапазон субповреждающих температур, не вызывающих повреждения тканей и основных функций организма, находится в пределах от 8–9°C до 0°C. Считается, что теплолюбивые растения, среди которых есть и экономически важные, например, рис, томат, огурец, кукуруза, также способны акклиматизироваться к холоду, однако нижняя граница субповреждающих температур для этой группы растений составляет 6–10°C, в зависимости от вида [27, 28]. Вопрос о расширении границ адаптационного потенциала ценных сельскохозяйственных растений до сих пор остается острым и открытым, а литературные данные свидетельствуют, что в этом направлении могут применяться и нанотехнологии (табл. 1).

Как показал проведенный нами анализ литературы, в большинстве случаев для повышения устойчивости растений к неблагоприятным температурам использовались НЧ металлов (серебра, золота, церия, оксидов кремния, титана и цинка), а также НЧ селена и хитозановые нанотрубки. Отметим, что ряд объектов, на которых испытывали НМ, был достаточно широк – от морозостойкой пшеницы до тропического банана, а наиболее используемым способом внесения НМ было опрыскивание листьев. Как выяснилось, чаще всего, обработка растений НМ приводила к поддержанию роста и фотосинтеза в условиях охлаждения, а также снижению рисков окислительного стресса (табл. 1). Например, растения фасоли, выращенные из семян, обработанных растворами НЧ серебра и закаленные в течение 9 сут. при режиме 15/10°C (день/ночь), отличались более высокими показателями интенсивности роста и фотосинтеза, а в их листьях отмечено большее содержание хлорофиллов, чем у контрольных (необработанных) растений в тех же условиях [29]. Сходные данные об изменениях темпов роста и активности ФСА в условиях охлаждения получены на томате, резуховидке и пырее, обработанных НЧ селена, церия и оксида кремния, соответственно [30–32]. В наших опытах на пшенице показано, что из семян, обработанных НЧ золота, вырастали проростки, у которых при низкотемпературном закаливании интенсивность фотосинтеза была выше, а содержание хлорофиллов и сахаров в листьях больше, чем у контрольных (необработанных) растений [33]. К тому же проростки, обработанные НЧ золота, отличались большей морозоустойчивостью, которую определяли по выживаемости и выходу электролитов из тканей после промораживания [34]. Накопление пролина и сахаров, обладающих осмопротекторными свойствами, наблюдали в условиях охлаждения под влиянием НЧ оксида титана и хитозановых нанотрубок у лакрицы и банана [35, 36]. Снижение накопления МДА и АФК на фоне усиления активности ферментов АОС отмечено у резуховидки, нута, лакрицы и риса под влиянием НЧ церия, оксидов титана и цинка [31, 35, 37–39].

В целом следует отметить, что НМ являются перспективными адаптогенами, поддерживающими метаболизм и развитие растений в условиях охлаждения, а также увеличивающими устойчивость как холодостойких, так и теплолюбивых культур к низким температурам.

ВЛИЯНИЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА РАСТЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР

В условиях действия высоких температур у растений развиваются обезвоживание и окислительный стресс. Это связано с тем, что с одной

Таблица 1. Влияние наноматериалов на растения в условиях действия низких температур

Размер, нм	Доза*, мкг/мл	Способ обработки	Температура и экспозиция	Объект	Наблюдаемые эффекты	Ссылка
				Ag		
10	0.25, 1.25, 2.5	Через семена	15/10°C, 9 сут	*Phaseolus vulgaris*	Поддержание всхожести, интенсивности роста, усиление фотосинтеза, увеличение содержания хлорофиллов в листьях	[29]
				Ce		
5	50	Через листья	4°C, 5 сут	*Arabidopis thaliana*	Снижение содержания АФК, увеличение квантового выхода ФС II, скорости ассимиляции углерода и карбоксилирования РБФК/О	[31]
				Se		
8–15	1, 4, 8, 12	Через корни	10°C, 1 сут	*Lycopersicum esculentum*	Поддержание интенсивности роста, увеличение содержания воды и хлорофиллов в листьях	[30]
				SiO_2		
10–15	5, 20, 40, 60, 80	Через семена	4°C, 7 сут	*Agropyron elongatum*	Поддержание темпов прорастания семян и интенсивности роста проростков	[32]
				TiO_2		
7–40	5	Через листья	4°C, 2 сут	*Cicer arietinum*	Снижение выхода электролитов и содержания МДА	[37]
7–4	5	Через листья	4°C, 6 сут	*Cicer arietinum*	Снижение выхода электролитов, содержания H_2O_2, усиление активности ферментов АОС, увеличение содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях	[38]
7–4	5	Через листья	4°C, 6 сут	*Cicer arietinum*	Усиление активности ферментов РБФК/О и ФЕПКК, увеличение уровней экспрессии генов, вовлеченных в синтез РБФК/О и хлорофилл-связывающих белков	[65]
10–25	2, 5	Через корни	4°C, 2 сут	*Glycyrrhiza glabra*	Снижение содержания МДА и H_2O_2, накопление пролина, сахаров и фенолов в листьях	[35]
				ZnO		
30	25, 50, 100	Через листья	10°C, 5 сут	*Oryza sativa*	Усиление роста, снижение содержания H_2O_2 и МДА, усиление активности ферментов АОС и увеличение уровня экспрессии генов АОС, а также транскрипционных факторов, участвующих в ответе на охлаждение	[39]
				Хитозановые нанотрубки		
<100 нм	100, 200, 400	Через листья	5°C, 3 сут	*Musa acuminata*	Снижение содержания МДА и АФК, поддержание интенсивности роста, увеличение содержания хлорофиллов, пролина, сахаров в листьях, усиление активности ферментов АОС	[36]

Примечание. Доза* – концентрация НМ в коллоидном растворе.

стороны, температура выше оптимальных значений вызывает у растений резкое увеличение транспирации и последующую дегидратацию. С другой стороны, высокие температуры стимулируют выработку у растений АФК, создавая риск окислительного стресса, обусловленного интенсификацией процессов ПОЛ и потерей целостности структуры клеточных мембран [1]. Под влиянием высоких температур ингибируются рост и развитие растений, нарушается синтез хлорофиллов и белков, угнетается активность ферментов, прежде всего фотосинтетических. Основными мишенями в ФСА при тепловом стрессе являются ФС II, РБФК/О и АТФ-генерирующие системы. Важными механизмами теплоустойчивости растений являются увеличение стабильности ферментов, структуры мембран, синтез белков теплового шока, усиление активности ферментов АОС [1].

Исследования, проведенные на широком ряде объектов с разной чувствительностью к высокой температуре, показали, что многие НМ могут быть использованы для защиты растений от последствий теплового стресса (табл. 2). В основном в опытах применяли НЧ серебра, церия, железа и селена, а также оксидов кремния, титана и цинка, внесенные преимущественно через корни или листья. Увеличение интенсивности ростовых процессов под влиянием НМ в условиях действия высоких температур наблюдали на растениях пшеницы, томата, огурца, кукурузы и сои [30, 40–46]. К тому же обработка НМ влияла на водный обмен растений – регулировала транспирацию и содержание воды в листьях [30, 41, 42, 45, 47], а также стимулировала накопление пролина, сахаров и белков [44, 45, 48], усиливала активность ферментов АОС [41, 42, 45, 46, 49, 50]. Кроме того, некоторые НМ в условиях повышенной температуры способны благотворно влиять на ФСА растений. В этом плане были изучены НЧ селена, оксидов кремния и титана [31, 47]. Например, под влиянием НЧ селена наблюдали увеличение квантового выхода ФС II, ассимиляции углерода и карбоксилирования РБФК/О на фоне снижения аккумуляции АФК в тканях резуховидки [31].

Таким образом, обработка растений НМ защищает их от действия как низких, так и высоких неблагоприятных температур, и уже предложены возможные механизмы, через которые НМ действуют на растительный организм, повышая его стрессоустойчивость.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ

Как показывают исследования, НМ поддерживают рост и водный обмен, благотворно влияют на ФСА, а также про-/антиоксидантный баланс растений, увеличивая их стрессоустойчивость и способствуя выживанию в неблагоприятных условиях (рис. 1). Остановимся на основных механизмах действия НМ на растения.

Влияние НМ на рост и водный обмен. Стимулирующее действие НМ на рост и водный обмен связывают с их способностью улучшать поглощение воды и питательных веществ [51, 52], видимо, за счет активации генов, участвующих в регуляции работы аквапоринов [6] и ответственных за клеточный цикл [13, 53]. Показано, например, что углеродные нанотрубки регулировали экспрессию генов, кодирующих белки аквапоринов в семенной оболочке [54], а НЧ золота изменяли распределение пектинов в клеточной стенке корней, увеличивая ее жесткость и стрессоустойчивость [55]. Имеются данные, что НЧ золота влияют на гены *DGR1* и *DGR2*, кодирующие белки клеточной стенки и участвующие в удлинении корней [20]. НЧ способны влиять на дифференцировку клеток через miRNA – малые некодирующие РНК, участвующие в контроле многих биологических процессов, и в том числе стрессового ответа. Например, НЧ золота влияли на экспрессию miR398, miR408, miR164, miR167 и miR169 у растений резуховидки [56]. При этом экспрессия miR167 была связана с работой генов, регулирующих репродуктивные функции растений за счет влияния на пути передачи ауксинового сигнала. Изменение экспрессии miR169, miR398 и miR408 влияло на размеры проростков, развитие их корневой системы и было причиной раннего цветения растений и ускоренного созревания семян [56]. Кроме того, установлено, что НЧ железа регулировали экспрессию гена *AHA2*, ассоциированного с открытием устьиц при засухе [57]. Следует также отметить, что некоторые НМ способны стимулировать накопление в тканях растений низкомолекулярных веществ, защищающих от дегидратации. Так, обработка НЧ серебра и оксида титана приводила к существенному увеличению содержания пролина у пшеницы [11] и горошка [58].

Влияние НМ на ФСА. Влияние НМ на ФСА растений связано, прежде всего, с эффектом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), характерного для многих металлических НЧ. Поверхностными плазмонами в физике называют коллективные колебания электронов на поверхности металла, а возбуждение поверхностных плазмонов светом называют ППР [59]. Под влиянием света определенной длины волны активность электронов на поверхности НЧ многократно возрастает [60]. Предполагают, что активные электроны на поверхности металлических НЧ могут “улавливать” фотоны света и облегчать передачу энергии в ССК, вызывая внутри него плазмонное усиление фотонов и многократно увеличивая абсорбцию света [60–62]. Считается, что именно вследствие этих изменений под влиянием НЧ

Таблица 2. Влияние наноматериалов на растения в условиях действия высоких температур

Размер, нм	Доза*, мкг/мл	Способ обработки	Температура и экспозиция	Объект	Наблюдаемые эффекты	Ссылка
			Ag			
10	25, 50, 75, 100	Через корни	35/40°C 3 ч/сут в течение 3 сут	*Triticum aestivum*	Увеличение интенсивности роста, содержания воды, хлорофиллов, активности ферментов АОС	[41, 42]
			Ce			
4.6	50	Через листья	35°C, 2.5 ч	*Arabidopis thaliana*	Снижение содержания АФК, увеличение квантового выхода ФС II, ассимиляции углерода, карбоксилирования Рубиско	[31]
			Se			
8–15	1, 4, 8, 12	Через корни	40°C, 1 сут	*Lycopersicum esculentum*	Увеличение интенсивности роста, содержания воды и хлорофиллов	[30]
10–40	50, 100	Через корни и листья	28/28°C, 10 сут	*Sorghum bicolor*	Увеличение активности ферментов АОС	[49]
50–200	25	Через листья	Полевые условия	*Cucumis sativus*	Увеличение интенсивности роста, фотосинтеза, содержания хлорофиллов	[43]
			SiO_2			
20–30	1.66	Через корни	45°C, 5 ч	*Triticum aestivum*	Снижение проницаемости мембран, увеличение квантового выхода ФС II, содержания хлорофиллов, растворимых сахаров и белков, пролина, усиление экспрессии ряда генов, кодирующих белки сборки ФС II	[66]
			TiO_2			
16	0.05, 0.1, 0.2	Через листья	35°C, 7 сут	*Lycopersicon esculentum*	Усиление интенсивности фотосинтеза, устьичной проводимости и транспирации, скорости электронного транспорта и нефотохимического тушения флуоресценции	[47]

Таблица 2. Окончание

Размер, нм	Доза*, мкг/мл	Способ обработки	Температура и экспозиция	Объект	Наблюдаемые эффекты	Ссылка
25	1.5, 10	Через семена	32°C, 12 сут	*Triticum aestivum*	Снижение содержания МДА и H_2O_2, увеличение интенсивности роста, содержания фенолов, активности ферментов АОС	[46]
			ZnO			
24	50, 100, 200, 400, 800, 1600	Через семена	30°C, 10 сут	*Zea mays*	Усиление интенсивности роста	[40]
80	10	Через листья	Полевые условия	*Triticum aestivum*	Снижение содержания МДА, увеличение активности ферментов АОС	[50]
20	0.1, 0.5, 1	Через корни	37°C, 4 ч	*Arabidopsis thaliana*	Усиление экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока	[70]
200–800	5, 10, 15, 20	Через семена и листья	36/20°C, 5 сут	*Triticum aestivum*	Снижение проницаемости мембран, содержания МДА и H_2O_2, увеличение интенсивности роста, содержания фотосинтетических пигментов, растворимых сахаров и белков, пролина, активности ферментов АОС	[44]
20	30, 60, 90	Через листья	45/34°C, 7 сут	*Medicago sativa*	Снижение проницаемости мембран, содержания МДА, H_2O_2, увеличение интенсивности роста, фотосинтеза, устьичной проводимости, активности ферментов АОС, содержания пролина и сахаров в листьях	[45]
25	1.5, 10	Через семена	32°C, 12 сут	*Triticum aestivum*	Снижение содержания МДА и H_2O_2, увеличение интенсивности роста, содержания фенолов, активности ферментов АОС	[46]

Примечание. Доза* – концентрация НМ в коллоидном растворе.

Рис. 1. Защитные эффекты наноматериалов на растения в условиях температурного стресса.

увеличиваются скорости электронного транспорта, фотофосфорилирования и выхода кислорода [60, 63].

В наших опытах на проростках пшеницы показано, что НЧ золота изменяли не только функциональную активность ФСА и ультраструктуру хлоропластов, но также биохимический состав мембран, стимулируя формирование крупных гран, в мембранах которых было увеличено количество ненасыщенных жирных кислот [64]. Это способствовало увеличению морозоустойчивости растений и их выживанию после промораживания [33, 34]. Такого рода данные позволяют предполагать, что НМ могут регулировать структурно-функциональную организацию ФСА на молекулярно-генетическом уровне. В пользу этого предположения свидетельствуют факты о том, что НЧ оксида титана усиливали экспрессию генов, кодирующих единицы РБФК/О (*CaLRubisco, CasRubisco*) и хлорофилл-связывающие белки у нута при 4°С [65]. В условиях теплового стресса НЧ оксида кремния усиливали экспрессию генов, кодирующих белки сборки ФС II – PsbH, PsbB и PsbD [66].

Влияние НМ на про-/антиоксидантный баланс. АФК традиционно считали нежелательными побочными продуктами метаболических реакций, однако, согласно исследованиям последних лет, именно они играют центральную роль в акклиматизации растений. Известно, что в неблагоприятных условиях чрезмерное накопление АФК приводит к ингибированию роста и развития, повреждению мембран, белков, нуклеиновых кислот, и, в конце концов, гибели растения. Однако, если концентрация АФК не достигает определенного порогового уровня, то они выступают как сигнальные молекулы, играющие ключевую роль в ответе растений на стресс [17, 23]. Активируя генерацию АФК, НМ не только индуцируют окислительный стресс, но и регулируют их сигнальные функции. Обработка растений НМ в определенной дозе запускает генерацию АФК, а также увеличивает стрессоустойчивость растений путем стимуляции широкого спектра защитных путей [17]. Поэтому НМ могут быть использованы, с одной стороны, как нейтрализаторы АФК (“наноэнзимы”), а с другой стороны, могут выступать в роли триггеров АФК для стимуляции защитных сил растительного организма, то есть своеобразной подготовки его к будущему стрессу.

С одной стороны, НМ влияют на про-/антиоксидантный баланс за счет высвобождения с их поверхности ионов, которые повреждают клетки

и их структурные компоненты, усиливая образование АФК [15]. С другой стороны, благодаря эффекту ППР, многие НМ (в частности, металлические НЧ) способны забирать на себя "лишнюю" энергию возбужденных электронов в ФС и "гасить" избыточное возбуждение хлорофилла [67], выступая в качестве протекторов окислительного стресса и фотоингибирования. Скорее всего, с эффектом ППР связаны и каталитические свойства НМ, описанные, например, для НЧ оксида церия, как "наноэнзима" с антиоксидантной активностью, способного обезвреживать супероксидрадикал и разлагать H_2O_2. Схожие антиоксидантные свойства отмечены для НЧ золота, кобальта и железа [68]. Показано влияние многих НМ на экспрессию генов, кодирующих синтез элементов АОС [69]. Например, НЧ оксида цинка усиливали экспрессию генов *OsCu/ZnSOD1*, *OsCu/ZnSOD2*, *OsCu/ZnSOD3*, *OsPRX11*, *OsPRX65*, *OsPRX89*, *OsCATA* и *OsCATB* у риса при 10°C [39].

Участие НМ в регуляции стрессового ответа. Имеются данные, что НМ действуют как стрессовые сигнальные молекулы, которые в растительном организме "включают" молекулярные механизмы адаптационных процессов, незадействованные до этого. Например, НЧ серебра регулировали экспрессию генов, кодирующих белки-переносчики анионов, и ферменты, вовлеченные в протеолитические процессы [70]. Авторы предполагают, что НЧ серебра могли встраиваться в плазмалемму и активировать ангидразы и целлюлозосинтазы, регулируя протеолитические процессы.

В литературе имеются сведения о том, что некоторые НЧ способны регулировать непосредственно гены стрессового ответа. Например, НЧ серебра изменяли экспрессию генов, вовлеченных в стрессовый ответ на засоление [12, 70], а НЧ оксида цинка влияли на экспрессию транскрипционных факторов (*ZIP*, *MIB* и *WRKY*), участвующих в ответе на холодовой стресс [39]. Интересные результаты получены в опытах на растениях резуховидки, у которых в условиях теплового стресса НЧ оксида цинка стимулировали экспрессию генов *hsfa2*, *hsp70* и *hsp101*, участвующих в синтезе белков теплового шока [71]. Показано также, что НЧ серебра в оптимальных условиях регулировали 35% генов, вовлеченных в ответ на низкотемпературный стресс, в частности *DREB1A/CBF3* (dehydration response element B1A), регулирующий ICE-CBF-COR сигнальный путь [70].

В последние годы активно обсуждается способность НЧ запускать классические стрессовые сигнальные реакции, например, Ca^{2+}-ассоциированный сигнальный путь. Известно, что кальций является вторичным мессенджером, играющим важнейшую роль в сигнальных реакциях растений на стресс. Стрессовый стимул вызывает мобилизацию Ca^{2+} в цитозоле, а связывание ионов с кальциевыми каналами запускает изменения уровней экспрессии генов, отвечающих за адаптацию к стрессу и ответ растительного организма на неблагоприятное воздействие [6]. Использование протеомного подхода показало, что НЧ серебра действуют на белки, связанные с передачей кальциевого сигнала [72]. Авторы выдвинули гипотезу, что ионы серебра, освобождаясь с поверхности наночастиц, вступают в клеточный метаболизм, связываясь с рецепторами кальция и Ca^{2+}/Na^{+}-каналами. Установлено, что нанокристаллы фуллерена С60 способны функционально модулировать Ca^{2+}-/кальмодулинзависимую протеинкиназу [73]. Предполагают, что НМ могут заменять Ca^{2+} в кальциевых каналах и имитировать действие кальция, вызывая каскад стрессовых реакций [5, 6]. В пользу данного предположения свидетельствует факт, что НЧ меди именно через Ca^{2+}-сигналинг запускали SOS (salt overly sensitive) сигнальные пути [19].

Полученные на сегодняшний день экспериментальные данные позволяют сделать предварительные выводы о механизмах защитного действия НМ на растительный организм. Главным образом действие НМ на многие процессы в растительном организме объясняется их способностью регулировать экспрессию ряда генов. Однако до сих пор не известен путь передачи сигнала от НМ до генетической составляющей, в связи с чем, необходимо продолжать исследования в этом направлении для разработки определенных стратегий использования НМ как адаптогенов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ КАК СТРАТЕГИЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Эффекты НМ на растительный организм зависят от целого ряда факторов, которые необходимо учитывать при планировании экспериментальной работы в зависимости от ее цели и задач (рис. 2). Прежде всего, при работе с НМ необходимо учитывать их *химическую природу и стабильность*. Достаточно часто в исследованиях используют НМ на основе металлов. Во-первых, металлосодержащие НМ более активны с химической точки зрения, а, во-вторых, более стабильны, чем сложные композиты, включающие в себя органические и неорганические соединения. Металлосодержащие НМ достаточно легко синтезируются из недорогих реактивов, как правило, солей, содержащих ионы необходимого металла [18]. В итоге получают коллоидные растворы (золи), обладающие уникальными свойствами. Именно для металлических НЧ характерен эффект ППР, обеспечивающий их влияние на ФСА и про-/антиоксидантный баланс растений. Все это делает перспективным использование НМ на основе металлов для защиты растений от действия абиотических стрессоров, в том числе, температурного.

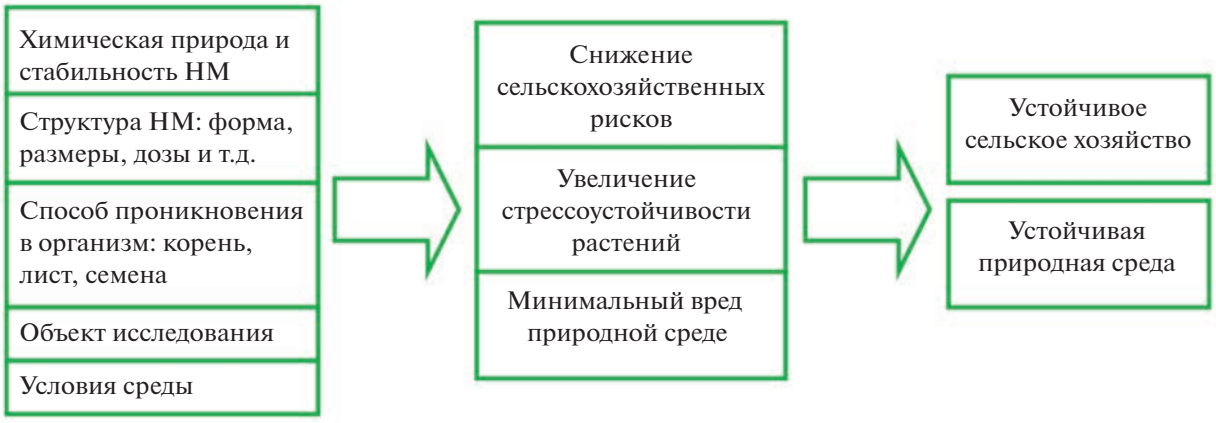


Рис. 2. Стратегии использования наноматериалов для защиты растений.

Стабильность тех или иных НМ часто зависит от их химической природы и способа получения. В частности, ставший популярным в последние годы “зеленый” синтез НМ с помощью бактерий и растительных экстрактов не всегда дает нужный результат, поскольку является длительным, а образующиеся НМ редко обладают нужной стабильностью [74, 75].

Существует мнение, что каждый тип НМ имеет свои специфические особенности действия на растения [14, 76]. Например, НЧ оксида кремния в основном действуют на рост растений за счет увеличения использования воды и питательных веществ [14]. Кроме того, эти НЧ способствуют накоплению пролина, свободных аминокислот, повышению активности антиоксидантных ферментов и, таким образом, усиливают стрессоустойчивость растений.

Углеродные нанотрубки обладают уникальными механическими, электрическими, термическими и химическими свойствами, и, проникая через клеточную стенку и мембрану, обеспечивают доставку химических веществ в клетку. Поэтому они используются как нанотранспортеры для переноса молекул ДНК и красителей в клетки растений [14]. Индуцируя перенос воды, ионов кальция и железа, нанотрубки усиливают рост корней и побегов, накопление биомассы, цветение и урожайность растений. Было показано, что нанотрубки регулируют экспрессию транскриптов, кодирующих несколько типов белков водных каналов, а также белки, участвующие в клеточном делении [13, 14, 52, 53].

НЧ оксида титана регулируют окислительно-восстановительные реакции и имеют свойства фотокатализаторов. Эти НЧ стимулируют прорастание семян, синтез хлорофилла, активность РБФК/О и интенсивность фотосинтеза, а также защищают хлоропласты от старения за счет усиления активности ферментов АОС [14].

НЧ церия обладают свойствами “наноэнзимов” и могут нейтрализовывать АФК [31]. По мнению авторов, обработка НЧ цезия является перспективным способом утилизации АФК и защиты растений от окислительного стресса. Эти НЧ увеличивают поглощение световой энергии, ускоряют темновые реакции фотосинтеза, обеспечивают высокую скорость карбоксилирования РБФК/О [31].

НЧ золота считаются одними из перспективных НМ для использования в биологии из-за простоты синтеза, высокой стабильности и каталитической активности [15, 77]. Именно НЧ золота, благодаря высокой совместимости с живыми организмами и химической инертности, широко используются в медицине для лечения онкологических заболеваний, а также в качестве лекарственных препаратов с высокой антибактериальной и антигрибковой активностью [78, 79]. Предполагается, что НЧ золота могут быть вовлечены в процессы дифференцировки клеток и использоваться в регенеративной медицине [80]. В наших исследованиях на пшенице показано, что нанопрайминг семян коллоидным раствором НЧ золота приводил к увеличению холодоустойчивости проростков за счет влияния на ростовые процессы, активность ФСА, адаптивную ультраструктурную и биохимическую реорганизацию фотосинтетических мембран [33, 34, 64]. НЧ золота обладают выраженными каталитическими свойствами благодаря эффекту ППР [59, 66, 78, 79]. Однако необходимы дополнительные исследования для более глубокого понимания механизмов влияния НЧ золота на стрессоустойчивость растений.

Второе, что следует учитывать при работе с НМ – это *эффект гормезиса*. Для НМ характерен четкий концентрационный эффект: низкие дозы

НМ оказывают выраженный позитивный эффект на организм, в то время как высокие дозы приводят к обратной картине [75]. Например, в опытах на растениях горчицы показано, что 10-суточная экспозиция на растворах НЧ золота в концентрациях 50 и 100 мкг/мл не вызывала накопления АФК в листьях, но оно наблюдалось при использовании концентрации 400 мкг/мл [81]. Значение имеют и размеры НМ. Считается, что НМ размером 15–20 нм наименее токсичны, поскольку им легче проникать через биологические барьеры, тогда как более крупные НМ могут их нарушать, вызывая токсические эффекты [15].

Третьим важным фактором, который следует учитывать при использовании НМ, является *способ проникновения в растительный организм* – через корни, листья (опрыскивание) или семена (нанопрайминг). При попадании через корни НМ проникают сначала в корневые волоски, а затем могут перемещаться по симпласту и/или апопласту. Следует помнить, что внесение НМ в почву способствует агрегации, поэтому при корневом внесении НМ лучше использовать водную культуру. При внекорневом внесении (через листья) НМ попадают в растения через устьица или кутикулу, а далее проникают в клетки мезофилла и/или перемещаются по флоэме [17]. Одним из наиболее эффективных способов обработки растений НМ считают нанопрайминг, при котором НМ проникают в семена, изменяя метаболизм растений. Именно нанопрайминг семян приводит к увеличению устойчивости и урожайности растений при минимальном накоплении НМ в тканях [5]. На сегодняшний день это самая эффективная, рентабельная и экологически чистая стратегия повышения посевных качеств семян (энергия прорастания, всхожесть, устойчивость к патогенам и др.), а также стимуляции роста и урожайности растений [17]. Проникнув в семена, НМ стимулируют синтез и накопление осмолитов, усиление АОС и активности ферментов – амилаз, липаз и протеаз, которые разрушают макромолекулы, содействуя развитию зародыша [17]. Однако дальнейшая судьба НМ, возможность их попадания в корневую систему и наземную часть растений изучены недостаточно.

Еще одним важным этапом в стратегии использования НМ является *выбор объектов исследования*. Реакция разных видов и даже сортов растений на действие НМ может отличаться. Например, НЧ золота в концентрации 1000 мкг/мл стимулировали рост и увеличение содержания фотосинтетических пигментов у сои [60], в то время как у ячменя даже концентрация 50 мкг/мл вызывала угнетение роста [82]. В ряде работ отмечено отсутствие эффекта НЧ золота на некоторые растения, например, на рис, латук, перец, цуккини, фасоль и огурец [83–86]. В связи с этим приобретает важность проведения исследований с НМ на большом количестве разных объектов, отличающихся по реакции на стрессовые факторы. Так, у холодостойких и теплолюбивых растений механизмы формирования устойчивости, например, к низким температурам будут иметь свои особенности, поэтому и реакция на НМ у них может отличаться.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, НМ являются уникальными структурами, позволяющими растениям переживать неблагоприятное действие низких и высоких температур. Несмотря на это, использование НМ в биологии и сельском хозяйстве является рискованным и диктует необходимость разработки стратегий (рис. 2), учитывающих химическую природу НМ, их стабильность в среде, поиск дозы НМ и способа обработки ими растений, которые обеспечат максимальный прирост стрессоустойчивости при минимальном накоплении НМ в тканях объекта, выбор которого тоже имеет большое значение. Разработка стратегий использования НМ как адаптогенов позволит достигнуть снижения сельскохозяйственных рисков, то есть, ориентирована на развитие устойчивого сельского хозяйства. При этом важной остается задача увеличения не только урожайности, но и стрессоустойчивости растений с нанесением минимального вреда природе и человеку. Эта задача позволяет ученым говорить о развитии представлений об устойчивой природной среде, необходимой для успешного существования живых организмов на планете.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ali Sh., Rizwan M., Arif M.S., Ahmad R., Hasanuzzaman M., Ali B., Hussain A.* Approaches in enhancing thermotolerance in plants: an updated review // J. Plant Growth Regul. 2020. V. 39. P. 456. https://doi.org/10.1007/s00344-019-09994-x
2. *John R., Anjum N.A., Sopory S.K., Akram N.A., Ashraf M.* Some key physiological and molecular processes of cold acclimation // Biol. Plant. 2016. V. 60. P. 603. https://doi.org/10.1007/s10535-016-0648-9
3. *Dev A., Srivastava A.K., Karmakar S.* Nanomaterial toxicity for plants // Environ. Chem. Lett. 2018. V. 16. P. 85. https://doi.org/10.1007/s10311-017-0667-6
4. *Venzhik Yu.V., Moshkov I.E., Dykman L.A.* Influence of nanoparticles of metals and their oxides on the photosynthetic apparatus of plants // Biol. Bull. 2021. V. 48.

P. 140.
https://doi.org/10.1134/S106235902102014X

5. *Sarraf M., Vishwakarma K., Kumar V., Arif N., Das S., Johnson R., Janeeshma E., Puthur J.T., Aliniaeifard S., Chauhan D.K., Fujita M.* Metal/metalloid-based nanomaterials for plant abiotic stress tolerance: an overview of the mechanisms // Plants. 2022. V. 11. P. 316.
https://doi.org/10.3390/plants11030316
6. *Khan M.N., Mobin M., Abbas Z.K., AlMutairi K.A., Siddiqui Z.H.* Role of nanomaterials in plants under challenging environments // Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 110. P. 194.
https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038
7. *Rizwan M., Ali S., Ali B., Adrees M., Arshad M., Hussain A., ur Rehman M.Z., Waris A.A.* Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat // Chemosphere. 2019. V. 214. P. 269.
https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120
8. *Mohammadi H., Amani-Ghadim A.R., Matin A.A., Ghorbanpour M.* Fe^0 nanoparticles improve physiological and antioxidative attributes of sunflower (*Helianthus annuus*) plants grown in soil spiked with hexavalent chromium // 3 Biotech. 2020. V. 10. P. 19.
https://doi.org/10.1007/s13205-019-2002-3
9. *Bidi H., Fallah H., Niknejad Y., Tari D.B.* Iron oxide nanoparticles alleviate arsenic phytotoxicity in rice by improving iron uptake, oxidative stress tolerance and diminishing arsenic accumulation // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 163. P. 348.
https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.020
10. *Latef A.A., Alhmad M.F., Abdelfattah K.E.* The possible roles of priming with ZnO nanoparticles in mitigation of salinity stress in lupine (*Lupinus termis*) plants // J. Plant Growth Regul. 2017. V. 36. P. 60.
https://doi.org/0.1007/s00344-016-9618-x
11. *Mohamed A.K.S.H., Qayyum M.F., Abdel-Hadi Ah.M., Rehman R.A., Ali Sh., Rizwan M.* Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat // Arch. Agron. Soil Sci. 2017. V. 63. P. 1736.
https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1300256
12. *Almutairi Z.M.* Influence of silver nano-particles on the salt resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) during germination // Int. J. Agric. Biol. 2016. V. 18. P. 449.
13. *Khodakovskaya M.V., de Silva K., Biris A.S., Dervishi E., Villagarcia H.* Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells // ACS Nano. 2012. V. 6. P. 2128.
https://doi.org/10.1021/nn204643g
14. *Siddiqi K.S., Husen A.* Engineered gold nanoparticles and plant adaptation potential // Nanoscale Res. Let. 2016. V. 11: 400.
https://doi.org/10.1186/s11671-016-1607-2
15. *Ковалева Н.Ю., Раевская Е.Г., Рощин А.В.* Проблемы безопасности наноматериалов: нанобезопасность, нанотоксикология, наноинформатика // Химическая безопасность. 2017. Т. 1. С. 44.
https://doi.org/10.25514/CHS.2017.2.10982
16. *Tighe-Neira R., Carmorac E., Recioc G., Nunes-Nesid A., Reyes-Diaze M., Alberdie M., Rengelg Z., Inostroza-Blancheteau C.* Metallic nanoparticles influence the structure and function of the photosynthetic apparatus in plants // Plant Physiol. Biochem. 2018. V. 130. P. 408.
https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.024
17. *Zhao L., Bai T., Wei H., Gardea-Torresdey J.L., Keller A., White J.C.* Nanobiotechnology-based strategies for enhanced crop stress resilience // Nature Food. 2022. V. 3. P. 829.
https://doi.org/10.1038/s43016-022-00596-7
18. *Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г.* Методы синтеза наночастиц с плазмонным резонансом. Саратов: Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 2009. 35 с.
19. *Rajput V.D., Minkina T.M., Behal A., Sushkova S.N., Mandzhieva S., Singh R., Gorovtsov A., Tsitsuashvili V.S., Purvis W.O., Ghazaryan K.A., Movsesyan H.S.* Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants, animals and soil organisms: a review // Environ. Nanotechnol. Monit. Manag. 2018. V. 9. P. 76.
https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.12.006
20. *Ferrari E., Barbero F., Busquets-Fité M., Franz-Wachtel M., Köhler H.-R., Puntes V., Kemmerling B.* Growth-promoting gold nanoparticles decrease stress responses in *Arabidopsis* seedlings // Nanomaterials. 2021. V. 11. P. 3161.
https://doi.org/10.3390/nano11123161
21. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевское чтение. Москва: Наука, 2007. 54 с.
22. *Theocharis A., Clément Ch., 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
23. *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
24. *Hurry V.* Metabolic reprogramming in response to cold stress is like real estate, it's all about location // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. P. 599.
https://doi.org/10.1111/pce.12923
25. *Ding Ya., Shi Yi., Yang Sh.* Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants // New Phytol. 2019. V. 222. P. 1690.
https://doi.org/10.1111/nph.15696
26. *Fürtauer L., Weiszmann J., Weckwerth W., Nägele Th.* Dynamics of plant metabolism during cold acclimation // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 5411.
https://doi.org/10.3390/ijms20215411
27. *Lukatkin A., Brazaitytė A., Bobinas Č., Duchovskis P.* Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review // Zemdirbyste-Agriculture. 2012. V. 99. P. 111.
28. *Brattacharya A.* Physiological processes in plants under low temperature stress. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2022. 734 p.
29. *Prażak R., Święciło A., Krzepiłko A., Michałek S., Arczewska M.* Impact of Ag nanoparticles on seed germination and seedling growth of green beans in normal and chill temperatures // Agriculture. 2020. V. 10: 312.
https://doi.org/10.3390/agriculture10080312

30. *Haghighi M., Abolghasemi R., Teixeira da Silva J.A.* Low and high temperature stress affect the growth characteristics of tomato in hydroponic culture with Se and nano-Se amendment // Scientia Horticulturae. 2014. V. 178. P. 231. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.006

31. *Wu H., Tito N. Giraldo J.P.* Anionic cerium oxide nanoparticles protect plant photosynthesis from abiotic stress by scavenging reactive oxygen species // ACS Nano. 2017. V. 11. P. 11283. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b05723

32. *Azimi R., Borzelabad M.J., Feizi H., Azimi A.* Interaction of SiO_2 nanoparticles with seed prechilling on germination and early seedling growth of tall wheatgrass (*Agropyron elongatum* L.). // Pol. J. Chem. Tech. 2014. V. 16. P. 25. https://doi.org/10.2478/pjct-2014-0045

33. *Venzhik Yu., Deryabin A., Popov V., Dykman L., Moshkov I.* Gold nanoparticles as adaptogens increasing the freezing tolerance of wheat seedlings // Environ. Sci. Poll. Res. 2022. V. 29. P. 5523. https://doi.org/10.1007/s11356-022-19759-x

34. *Venzhik Y.V., Deryabin A.N., Popov V.N., Dykman L.A., Titov A.F., Moshkov I.E.* Influence of gold nanoparticles on the tolerance of wheat to low temperature // Dokl. Biochem. Biophys. 2022. V. 502. P. 5. https://doi.org/10.1134/S1607672922010100

35. *Ghabel V.K., Karamian R.* Effects of TiO_2 nanoparticles and spermine on antioxidant responses of *Glycyrrhiza glabra* L. to cold stress // Acta Bot. Croat. 2020. V. 79. P. 137. https://doi.org/10.37427/botcro-2020-025

36. *Wang A., Li J., Al-Huqail A.A., Al-Harbi M.S., Ali E.F., Wang J., Ding Z., Rekaby S.A., Ghoneim A.M., Eissa M.A.* Mechanisms of chitosan nanoparticles in the regulation of cold sress resistance in banana plants // Nanomaterials. 2021. V. 11: 2670. https://doi.org/10.3390/nano11102670

37. *Mohammadi R., Maali-Amiri R., Abbasi A.* Effect of TiO_2 nanoparticles on chickpea response to cold stress // Biol. Trace Elem. Res. 2013. V. 152. P. 403. https://doi.org/10.1007/s12011-013-9631-x

38. *Mohammadi R., Maali-Amiri R., Mantri N.* Effect of TiO_2 nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress // Russ. J. Plant Physiol. 2014. V. 61. P. 768. https://doi.org/10.1134/S1021443714050124

39. *Song Y., Jiang M., Zhang H., Li R.* Zinc oxide nanoparticles alleviate chilling stress in rice (*Oryza sativa* L.) by regulating antioxidative system and chilling response transcription factors // Molecules. 2021. V. 26. P. 2196. https://doi.org/10.3390/molecules26082196

40. *Lypez-Moreno M.L., de la Rosa G., Cruz-Jiménez G., Castellano L., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L.* Effect of ZnO nanoparticles on corn seedlings at different temperatures; X-ray absorption spectroscopy and ICP/OES studies // Microchem. J. 2017. V. 134. P. 54. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.05.007

41. *Iqbal M., Iqbal Raja N., Mashwani Z.U.R., Hussain M., Ejaz M., Yasmeen F.* Effect of silver nanoparticles on growth of wheat under heat stress // Iran J. Sci. Technol. Trans Sci. 2019. V. 43. P. 387. https://doi.org/10.1007/s40995-017-0417-4

42. *Iqbal M., Iqbal Raja N., Mashwani Z.U.R., Wattoo F.H., Hussain M., Ejaz M., Saira H.* Assessment of AgNPs exposure on physiological and biochemical changes and antioxidative defence system in wheat (*Triticum aestivum* L.) under heat stress // IET Nanobiotechnol. 2019. V. 13. P. 230. https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5041

43. *Shalaby T.A., Abd-Alkarim E., El-Aidy F., Hamed E.-S., Sharaf-Eldin M., Taha A., El-Ramady H., Bayoumi Y., Rodrigues dos Reis A.R.* Nano-selenium, silicon and H_2O_2 boost growth and productivity of cucumber under combined salinity and heat stress // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2021. V. 12: 111962. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111962

44. *Azmat A., Tanveer Y., Yasmin H., Hassan M.N., Shahzad A., Reddy M., Ahmad A.* Coactive role of zinc oxide nanoparticles and plant growth promoting rhizobacteria for mitigation of synchronized effects of heat and drought stress in wheat plants // Chemosphere. 2022. V. 297: 133982. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133982

45. *Kareem H.A., Hassan M.U., Zain M., Irshad I., Shakoor N., Saleem S., Niu J.U., Skalicky M., Chen Zh., Guo Zh., Wang Q.* Nanosized zinc oxide (n-ZnO) particles pretreatment to alfalfa seedlings alleviate heat-induced morpho-physiological and ultrastructural damages // Environmental Pollution. 2022. V. 303: 119069. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119069

46. *Thakur S., Asthir B., Kaur G., Kalia A., Sharma A.* Zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles influence heat stress tolerance mediated by antioxidant defense system in wheat // Cereal Res. Commun. 2022. V. 50. P. 385. https://doi.org/10.1007/s42976-021-00190-w

47. *Qi M., Liu Yu., Li T.* Nano-TiO_2 improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress // Biol. Trace Elem. Res. 2013. V. 156. P. 323. https://doi.org/10.1007/s12011-013-9833-2

48. *Helal N.M., Khattab H.I., Emam M.M., Niedbała G., Wojciechowski T., Hammami I., Alabdallah N.M., Eldin Darwish D.B., El-Mogy M.M., Hassan H.M.* Improving yield components and desirable eating quality of two wheat genotypes using Si and NanoSi particles under heat stress // Plants. 2022. V. 11: 1819. https://doi.org/10.3390/plants11141819

49. *Djanaguiraman M., Belliraj N., Bossmann S.H., Vara Prasad P.V.* High-temperature stress alleviation by selenium nanoparticle treatment in grain srghum // ACS Omega. 2018. V. 3. P. 2479. https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01934

50. *Hassan N.S., Salah El Din T.A., Hendawey M.H., Borai I.H., Mahdi A.A.* Magnetite and zinc oxide nanoparticles alleviated heat stress in wheat plants // Current nanomaterials. 2018. V. 3. P. 32. https://doi.org/10.2174/2405461503666180619160923

51. *Zheng L., Hong F.S., Lu S.P., Liu C.* Effect of nano-TiO_2 on strength of naturally aged seeds and growth of spinach // Biol. Trace Elem. Res. 2005. V. 104. P. 83.

52. *Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M., Xu Y., Li Z., Watanabe F.* Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth // ACS Nano. 2009. V. 3. P. 3221. https://doi.org/10.1021/nn900887m

53. *Khodakovskaya M.V., de Silva K., Nedosekin D.A., Dervishi E., Biris A.S., Shashkov E.V., Galanzha E.I., Zharov V.P.* Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. V. 108. P. 1028. https://doi.org/10.1073/pnas.1008856108

54. *Lahiani M.H., Dervishi E., Chen J., Nima Z., Gaume A., Biris A.S., Khodakovskaya M.V.* Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2013. V. 5. P. 7965. https://doi.org/10.1021/am402052x

55. *Milewska-Hendel A., Witek W., Rypień A., Zubko M., Baranski R., Stróż D., Kurczyńska E.U.* The development of a hairless phenotype in barley roots treated with gold nanoparticles is accompanied by changes in the symplasmic communication // Sci. Rep. 2019. V. 9: 4724. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41164-7

56. *Kumar V., Guleria P., Kumar V., Yadav S.K.* Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana* // Sci. Total Environ. 2013. V. 461. P. 462. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.018

57. *Jalil S.U., Ansari M.I.* Nanoparticles and abiotic stress tolerance in plants: synthesis, action, and signaling mechanisms // Plant signaling molecule: role and regulation under stressful environments / Eds. Khan M.I.R., Reddy P.S., Ferrante A., Khan N.A. Chennai: Elsevier, 2019. P. 549.

58. *Castiglione M.R., Giorgetti L., Cremonini R., Bottega S., Spanò C.* Impact of TiO_2 nanoparticles on *Vicia narbonensis* L.: potential toxicity effects // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 1471. https://doi.org/10.1007/s00709-014-0649-5

59. *Хлебцов Н.Г.* Оптика и биофотоника частиц с плазмонным резонансом // Квантовая электроника. 2008. № 6. С. 504.

60. *Das S., Debnath N., Pradhan S., Goswami A.* Enhancement of photon absorption in the light-harvesting complex of isolated chloroplast in the presence of plasmonic gold nanosol – a nanobionic approach towards photosynthesis and plant primary growth augmentation // Gold Bull. 2017. V. 50. P. 247. https://doi.org/10.1007/s13404-017-0214-z

61. *Falco W.F., Botero E.R., Falcão E.A., Santiago E.F., Bagnato V.S., Caires A.R.L. In vivo* observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles // J. Photochem. Photobiol. A. 2011. V. 225. P. 65. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.09.027

62. *Torres R., Diz V., Lagorio M.G.* Effects of gold nanoparticles on the photophysical and photosynthetic parameters of leaves and chloroplasts // Photochem. Photobiol. Sci. 2018. V. 17. P. 505. https://doi.org/10.1039/C8PP00067K

63. *Li X., Sun H., Mao X., Lao Y., Chen F.* Enhanced photosynthesis of carotenoids in microalgae driven by light-harvesting gold nanoparticles // ACS Sustainable Chem Eng. 2020. V. 8. P. 7600. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00315

64. *Venzhik Yu., Deryabin A., Popov V., Dykman L., Moshkov I.* Priming with gold nanoparticles leads to changes in the photosynthetic apparatus and improves the cold tolerance of wheat // Plant Physiol. Biochem. 2022. V. 190. P. 145. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.09.006

65. *Hasanpour H., Maali-Amiri R., Zeinali H.* Effect of TiO_2 nanoparticles on metabolic limitations to photosynthesis under cold in chickpea // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 779. https://doi.org/10.1134/S1021443715060096

66. *Hassan H., Alatawi A., Abdulmajeed A., Emam M., Khattab H.* Roles of Si and SiNPs in improving thermotolerance of wheat photosynthetic machinery via upregulation of *PsbH, PsbB* and *PsbD* genes encoding PSII core proteins // Horticulturae. 2021. V. 7: 16. https://doi.org/10.3390/horticulturae7020016

67. *Kelly K.L., Coronado E., Zhao L.L., Schatz G.C.* The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment // J. Phys. Chem. B. 2003. V. 107. P. 668. https://doi.org/10.1021/jp026731y

68. *Wei H., Wang E.* Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes // Chem. Sov. Rev. 2013. V. 42. P. 6060. https://doi.org/10.1039/C8CS00457A

69. *Liu Y., Xiao Z., Chen F., Yue L., Zou H., Lyu J., Wang Z.* Metallic oxide nanomaterials act as antioxidant nanozymes in higher plants: trends, meta-analysis, and prospect // Sci. Total. Environ. 2021. V. 780. P. 146578. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146578

70. *Kohan-Baghkheirati E., Geisler-Lee J.* Gene expression, protein function and pathways of *Arabidopsis thaliana* responding to silver nanoparticles in comparison to silver ions, cold, salt, drought, and heat // Nanomaterials. 2015. V. 5. P. 436. https://doi.org/10.3390/nano5020436

71. *Wu J., Wang T.* Synergistic effect of zinc oxide nanoparticles and heat stress on the alleviation of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2020. V. 104. P. 49. https://doi.org/10.1007/s00128-019-02749-0

72. *Mirzajani F., Askari H., Hamzelou S., Schober Y., Röompp A., Ghassempour A., Spengler B.* Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2014. V. 108. P. 335. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.013

73. *Miao Y., Xu J., Shen Y., Chen L., Bian Y., Hu Y., Zhou W., Zheng F., Man N., Shen Y., Zhang Y., Wang M., Wen L.* Nanoparticle as signaling protein mimic: robust structural and functional modulation of CaMKII upon specific binding to fullerene C60 nanocrystals // ACS Nano. 2014. V. 8. P. 6131. https://doi.org/10.1021/nn501495a

74. *Чумаков Д.С., Соколов А.О., Богатырев В.А., Соколов О.И., Селиванов Н.Ю., Дыкман Л.А.* "Зеленый"

синтез наночастиц золота с использованием культур клеток *Arabidopsis thaliana* и *Dunaliella salina* // Российские нанотехнологии. 2018. Т. 13. С. 85.

75. *Singh A.K., Tiwari R., Singh V.K., Singh P., Khadim S.R., Singh U., Laxmia Srivastava V., Hasan S.H., Asthan R.K.* Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and in vitro anticancer activity on breast cancer cell line // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2019. V. 51. P. 164. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.023
76. *Iavicoli I., Leso V., Fontana L., Calabrese E.J.* Nanoparticle exposure and hormetic dose-responses: an update // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19: 805. https://doi.org/10.3390/ijms19030805
77. *Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г.* Биомедицинское применение многофункциональных золотых нанокомпозитов // Успехи современной биологии. 2016. Т. 516. С. 411.
78. *Dykman L., Khlebtsov N.* Gold nanoparticles in biomedical applications. Boca Raton: CRC Press, 2017. 332 p.
79. *Ramalingam V.* Multifunctionality of gold nanoparticles: plausible and convincing properties // Adv. Colloid Interface Sci. 2019. V. 271: 101989. https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.101989
80. *Pissuwan D., Poomrattanangoon R., Chungchaiyart P.* Trends in using gold nanoparticles for inducing cell differentiation: a review // ACS Appl. Nano Mater. 2022. V. 5. P. 3110. https://doi.org/10.1021/acsanm.1c04173
81. *Gunjan B., Zaidi M.G.H., Sandeep A.* Impact of gold nanoparticles on physiological and biochemical characteristics of *Brassica juncea* // J. Plant Biochem. Physiol. 2014. V. 2. P. 133. https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000133
82. *Feichtmeier N.S., Walther P., Leopold K.* Uptake, effects, and regeneration of barley plants exposed to gold nanoparticles // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. P. 8549. https://doi.org/10.1007/s11356-014-4015-0
83. *Hawthorne J., Musante C., Sinha S.K., White J.C.* Accumulation and phytotoxicity of engineered nanoparticles to *Cucurbita pepo* // Int. J. Phytoremediation. 2012. V. 14. P. 429. https://doi.org/10.1080/15226514.2011.620903
84. *Gopinath K., Gowri S., Karthika V., Arumugam A.* Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced seed germination activity of *Gloriosa superba* // J. Nanostruc. Chem. 2014. V. 4. P. 1. https://doi.org/10.1007/s40097-014-0115-0
85. *Barrena R., Casals E., Colón J., Font X., Sánchez A., Puntes V.* Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles // Chemosphere. 2009. V. 75. P. 850. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.078
86. *Ndeh N.T., Maensiri S., Maensiri D.* The effect of green synthesized gold nanoparticles on rice germination and roots // Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. 2017. V. 8: 035008.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 354–364

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1.577.21:575.113.12

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ УНИПОРТЕРОВ САХАРОВ СЕМЕЙСТВА *SWEET* В РЕГУЛЯЦИИ КАЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ПЛОДА У ВИДОВ ТОМАТА (*SOLANUM* СЕКЦИЯ LYCOPERSICON)[1]

© 2023 г. М. А. Филюшин[a], *, М. А. Слугина[a], А. В. Щенникова[a], Е. З. Кочиева[a]

[a] *Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, Россия*

**e-mail: michel7753@mail.ru*

Поступила в редакцию 18.01.2022 г.
После доработки 25.01.2023 г.
Принята к публикации 25.01.2023 г.

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) является важной агрокультурой и, благодаря существованию дикорастущих родственных видов (*Solanum* секция Lycopersicon), моделью для изучения развития сочного плода. В работе был проведен анализ экспрессии генов унипортеров сахаров *SWEET1a*, *1b*, *1e*, *3*, *7a*, *10a*, *12c*, *14* и *15* у видов и сортов томата. Для сорта Heinz (*S. lycopersicum*) выявлены гены, наиболее активные в корнях (*SWEET1e*, *3*, *10a* и *12c*), листьях (*SWEET 1a*, *1e*, *3*, *10a* и *12c*) и цветках (*SWEET1a*, *1b*, *7a*, *10a*, *12c*, *14* и *15*). Рост плода сопровождается повышением уровня транскриптов *SWEET110a* и *12c*, созревание плода – *SWEET1a* и *15*. Продемонстрирована дифференциальная экспрессия *SWEET1a*, *1b*, *12c* и *15* в спелом плоде инбредных линий от скрещивания *S. lycopersicum* сорт M82 × *S. pennellii*. ПЦР-РВ анализ показал, что общим для спелого плода анализируемых видов томата является экспрессия генов *SWEET1a* и *12c*, а для видов *S. pennellii*, *S. habrochaites* и *S. cheesmaniae* – *SWEET1b* и *10a*. Определено, что соотношение фруктоза : глюкоза эквимолярно у образцов, за исключением сортов Black Jack и White Beauty (фруктоза : глюкоза ≥ 1.10). Корреляций между уровнем транскриптов генов *SWEET* и соотношением гексоз не выявлено.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, дикорастущие виды томата, транспортеры сахаров, унипортеры SWEET, содержание сахаров в спелом плоде, соотношение глюкоза : фруктоза

DOI: 10.31857/S001533032360002X, **EDN:** PZWAJQ

ВВЕДЕНИЕ

Углеводы являются одними из наиболее важных молекул-аккумуляторов энергии, которые обеспечивают строительные компоненты для клеток растений. Доля их в отдельных тканях может достигать 90% и более сухого вещества. В результате фотосинтеза образуются простые сахара, включая глюкозу, количество и доступность которых оказывает ключевое влияние на координацию роста, развития и адаптивности растения [1]. Глюкоза, фруктоза и сахароза, транспортируются от источника (листья) через флоэму к накапливающим органам (цветы, плоды, семена и корни), где запасаются и используются для поддержания их роста и развития [1, 2].

Ключевая роль сахаров в регуляции роста и развития растения подчеркивается их участием в определении хозяйственно ценных признаков у агрокультур. Так, содержание и соотношение фруктозы и глюкозы значительно влияют на вкус спелых плодов томата *Solanum lycopersicum* L. [3] или ягод винограда *Vitis vinifera* L. [4] в силу того, что фруктоза слаще глюкозы и сахарозы в ~1.2–2.0 раз (https://www.nutrientsreview.com/articles/sweeteners.html).

Одна из самых популярных агрокультур – томат *Solanum lycopersicum* L. – входит в секцию Lycopersicon рода *Solanum* вместе с 12 дикорастущими родственными видами, относящимися к различным эволюционным группам [5]. Более древние из них (например, *S. habrochaites*, *S. pennellii* и другие зеленоплодные виды) формируют плоды, которые накапливают преимущественно сахарозу, тогда как в составе плодов эволюционно более молодых видов (например, желто/красноплодные виды *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и *S. cheesmaniae*) преобладают глюкоза и фруктоза [6–9]. У первых низкое содержание гексоз сочетается с

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S001533032360002X для авторизованных пользователей.

необычно высоким отношением фруктозы к глюкозе [7], тогда как последние накапливают данные гексозы в эквимолярных количествах [9]. При этом признак преимущественного по отношению к гексозам накопления сахарозы (сцеплен с активностью генов инвертаз и АДФ-глюкозопирофосфорилазы) и признак неравного соотношения гексоз (определяется локусом *Fgr* (*fructose to glucose ratio*)) наследуются независимо [9]. Так, в плодах линий томата *S. lycopersicum*, несущих аллель *FgrH*, интрогрессированный из *S. habrochaites* LA1777, содержание гексоз преобладает над содержанием сахарозы, а уровень фруктозы значительно выше уровня глюкозы [9, 10].

Локус *Fgr* идентифицирован в геноме томата как ген *SlFgr* (Solyc04g064610; https://solgenomics.net/; другое название гена *SlSWEET1a*, LOC101244279, Gene ID: 101244279), кодирующий белок семейства транспортеров сахаров SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) [10]. Повышенный уровень белка SlFgr соответствует высокому соотношению фруктоза : глюкоза в плодах, и оверэкспрессия гена *SlFgr* в трансгенных растениях томата ожидаемо приводит к увеличению данного соотношения [11].

Белки SWEET относятся к унипортерам, которые участвуют во многих биологических процессах, транспортируя сахара от фототрофных к гетеротрофным тканям растения [12, 13]. Семейство SWEET разделено на четыре клады, где транспортеры клад I и II переносят гексозы, III – сахарозу, и IV – фруктозу [14–16]. Считается, что различная локализация и углеводная специфичность этих белков обуславливают многообразие их физиологических функций, что показано на модельном виде *Arabidopsis thaliana* L. [17–25]. Так, в двунаправленном переносе глюкозы участвуют AtSWEET1 и 2 (в том числе, в ризосфере, внося вклад в устойчивость к патогенам), а также AtSWEET4–8 и 13. Дополнительно, AtSWEET5 транспортирует галактозу и отвечает за дозозависимую чувствительность к ней во время прорастания пыльцы, а AtSWEET8 и 13 задействованы в транспорте сахарозы, ассоциированном с фертильностью пыльцы. В транспорте сахарозы участвуют также AtSWEET9 (включая секрецию из паренхимы нектарника во внеклеточное пространство, где сахароза гидролизуется с образованием смеси сахарозы, глюкозы и фруктозы), AtSWEET11, 12 и 15 (включая отток сахарозы из оболочки семени в зародыш). С транспортом фруктозы связаны белки AtSWEET16 и 17 (в тонопластах листьев и корней, включая ответ на засуху) [17–25].

В геноме томата овощного *S. lycopersicum* сорта Heinz 1706 также идентифицировано и охарактеризовано (структура, филогения и профиль экспрессии) семейство генов *SWEET*. А именно, 9 генов клады I (*SlSWEET1a–3*; class Ia), 6 генов клады II (*SlSWEET5–7*; class Ic), 13 генов клады III (*SlNEC1* (*SlSWEET15*), *SlSWEET10a–c*, *SlSWEET11a–d*, *SlSWEET12a–d*, *SlSWEET14*; class II) и 2 гена клады IV (*SlSWEET16*, *SlSWEET17*; class Ib) [9, 15, 22]. На примере сортов Micro-Tom и Heinz (*S. lycopersicum*), а также красноплодного дикорастущего вида *S. pimpinellifolium* показано, что плоды в процессе созревания характеризуются высоким уровнем транскриптов *SlSWEET1e*, *SlSWEET3*, *SlSWEET7a*, *SlSWEET14*, *SlSWEET15*, *SlSWEET12c* и *SlSWEET10a* [22, 26, 27]. В случае зеленоплодных видов томата информация ограничена видом *S. habrochaites* и характеристикой одного гена – *Fgr* (*SWEET1a*), активность которого сцеплена с неравным соотношением фруктозы и глюкозы в плодах [9, 10].

В настоящей работе было проведено сравнение уровней транскриптов генов *SWEET1a*, *SWEET1b*, *SWEET1e*, *SWEET3*, *SWEET7a*, *SWEET10a*, *SWEET12c*, *SWEET14*, и *SWEET15* в спелом плоде у образцов четырех видов томата – трех дикорастущих (зеленоплодные *S. pennellii* и *S. habrochaites*, и желтоплодный *S. cheesmaniae*) и культивируемого вида (*S. lycopersicum*, семь сортов). Кроме того, был проведен сравнительный *in silico* анализ экспрессии данных генов в растениях сорта Heinz и вида *S. pimpinellifolium*, а также в спелом плоде сорта M82 *S. lycopersicum* в сравнении с 74 инбредными линиями M82 × *S. pennellii* LA0716. Экспрессионные данные были сопоставлены с показателями биохимического анализа содержания сахарозы, глюкозы и фруктозы. Полученные результаты будут способствовать углубленному пониманию роли унипортеров SWEET в определении содержания и соотношения растворимых сахаров в спелом плоде, что может быть использовано в селекции томата (в том числе, с помощью интрогрессивной гибридизации с дикорастущими видами) с улучшенными вкусовыми качествами плода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Для проведения исследования были выбраны образцы трех дикорастущих видов томата (зеленоплодные *S. pennellii* LA0716 и *S. habrochaites* LA2144; желтоплодный *S. cheesmaniae* LA0421) и семи сортов томата овощного *S. lycopersicum* (белоплодный White beauty; желтоплодный Самохвал; красноплодные Heinz и Long John; красно-коричневоплодные Paul Robeson, Black Jack и Black Cherry) (рис. 1). Растения были выращены в 2022 году в условиях пленочной теплицы ГБНУ “Федеральный научный центр овощеводства” (ФНЦО, Московская область, Россия). Плоды собирали в сентябре на стадии биологической спелости. В случае сортов томата *S. lycopersicum* и *S. cheesmaniae*, стадия биологической спелости соответствовала плоду мягкой текстуры, полностью сменившему окраску с

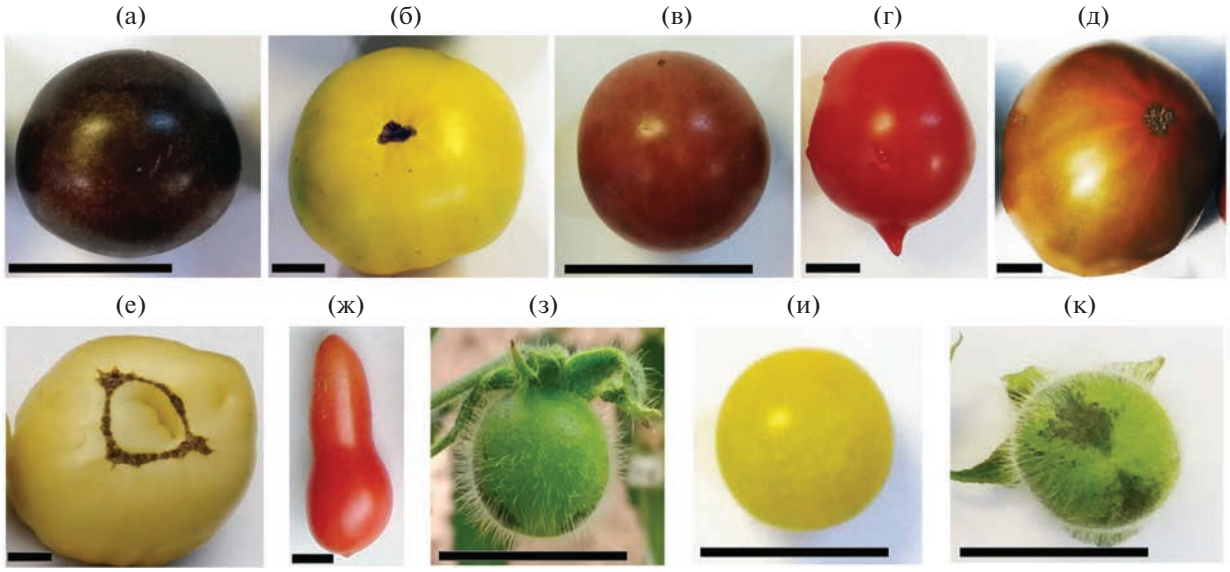


Рис. 1. Фотографии спелого плода *S. lycopersicum* (сорта Black Jack (а), Самохвал (б), Black cherry (в), Heinz (г), Paul Robeson (д), White beauty (е), Long John (ж)), *S. habrochaites* LA2144 (з), *S. cheesmaniae* LA0421 (и), *S. pennellii* LA0716 (к). Черная черта соответствует длине 1 см.

зеленой на финальную. В случае образцов зеленоплодных видов спелые плоды отбирали по размеру, соответствующему финальному, в сочетании с мягкой текстурой. Для биохимического и экспрессионного анализов использовали по одному спелому плоду от двух растений каждого анализируемого образца (вид, сорт).

Получение препаратов суммарной РНК и кДНК. Из ткани спелого плода (~ 0.05–0.10 г; кожица вместе с мякотью), предварительно измельченной растиранием в жидком азоте, выделяли суммарную РНК с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия). Препараты РНК очищали от примеси геномной ДНК (RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия), анализировали на качество (электрофорез в 1.5% агарозном геле) и количество (флуориметрия) и использовали для синтеза (с праймером oligo-dT) кДНК (GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Количество РНК и кДНК определяли флуориметрически на приборе Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit, Invitrogen, США).

Анализ профиля экспрессии генов *SWEET*. *In silico* анализ профиля экспрессии генов *SWEET* в различных органах *S. lycopersicum* сорт Heinz и *S. pimpinellifolium*, а также в спелом плоде *S. lycopersicum* сорт M82 и 74 инбредных линий *S. lycopersicum* сорт M82 × *S. pennellii* проводили с использованием базы данных Tomato Functional Genomics (http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/TFGD/digital/home.cgi). Визуализацию данных осуществляли с помощью программы для построения тепловых карт (http://www2.heatmapper.ca/expression/).

Количественную ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили в двух биологических и трех технических повторах с использованием CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США), 3.0 нг кДНК, ген-специфических праймеров и смеси SYBR Green RT-PCR (Синтол, Россия) при следующих условиях: денатурация при 95°C в течение 5 мин, далее 40 циклов денатурации (95°C, 15 с) и отжига/синтеза (60°C, 40 с). Нормализацию данных генной экспрессии осуществляли с применением референсных генов *Expressed* и *ACTIN2* [28]. Ген-специфичные праймеры (Дополнительные материалы, табл. 1) разрабатывали на основе последовательностей исследуемых генов в базе геномных данных томата (*SlSWEET1a* Solyc04g064610; *SlSWEET1b* Solyc04g064620; *SlSWEET1e* Solyc06g060590; *SlSWEET3* Solyc03g007360; *SlSWEET7a* Solyc08g082770; *SWEET12c* Solyc05g024260; *SWEET10a* Solyc03g097580; *SlSWEET14* Solyc03g097560; *SlSWEET15* Solyc09g074530; https://www.solgenomics.net/).

Анализ содержания сахарозы, глюкозы и фруктозы. Для ферментативного определения сахарозы, глюкозы и фруктозы с помощью спектрофотометрии (340 нм) использовали тест-систему Enzytec™ Liquid Сахароза/D-Глюкоза/D-Фруктоза (R-Biopharm AG, Германия) согласно протоколу производителя. Содержание сахаров измеряли в трех технических повторах. Соотношение фруктоза : глюкоза вычисляли, исходя из полученных средних значений с учетом средней ошибки (± SE).

Таблица 1. Содержание сахаров в спелом плоде исследуемых образцов видов томата

Вид/Сорт	Содержание сахаров, мг/г сырой массы; среднее значение ± SE			Соотношение фруктоза/глюкоза; среднее значение ± SE
	сахароза	глюкоза	фруктоза	
Томат овощной *S. lycopersicum*				
Black cherry	0.5 ± 0.1	30.1 ± 1.7	29.6 ± 0.8	0.98 ± 0.07
Heinz 1706BG	0	12.5 ± 1.0	13.7 ± 1.7	1.10 ± 0.22
Paul Robeson	0.6 ± 0.09	17.3 ± 0.9	17.1 ± 2.2	0.99 ± 0.17
Black Jack	2.0 ± 0.2	18.8 ± 2.6	23.5 ± 0.9	1.25 ± 0.19
Самохвал	0	18.2 ± 0.1	18.1 ± 3.4	0.99 ± 0.19
Long John	0	9.7 ± 1.9	9.8 ± 1.4	1.01 ± 0.29
White beauty	0	12.7 ± 9.0	14.2 ± 3.7	1.12 ± 0.41
Дикорастущие виды томата				
S. cheesmaniae LA0421	0.00	3.2 ± 0.1	3.4 ± 0.2	1.06 ± 0.09
S. pennellii LA0716	3.9 ± 0.8	3.5 ± 0.4	3.7 ± 0.2	1.06 ± 0.16
S. habrochaites LA2144	7.4 ± 0.2	7.1 ± 0.1	7.4 ± 0.2	1.04 ± 0.04

Статистический анализ. Статистическая обработка результатов ПЦР-РВ (вычисление стандартного отклонения) проводилась с помощью программы Graph Pad Prism v.8 (https://www.graphpad.com, США). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение (SD) на основе трех технических и двух биологических повторов. Для оценки различий применяли *t*-test ($P < 0.01$ указывает на статистическую значимость различия). Регрессионный анализ (поиск корреляции между уровнем экспрессии гена и соотношением глюкоза : фруктоза) проводили также с помощью программы GraphPad Prism v.8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Профиль экспрессии генов *SWEET* в различных органах видов *S. lycopersicum* и *S. pimpinellifolium*. Первичный анализ профиля экспрессии генов *SWEET* был проведен *in silico* в различных органах *S. lycopersicum* сорт Heinz и *S. pimpinellifolium*.

Было выявлено, что в корнях растений томата сорта Heinz наиболее активны гены *SWEET1e* (8.44 нормализованных чтений RPKM (Reads Per Kilobase Million)), *SWEET3* (8.99), *12c* (3.83) и *10a* (5.22); транскрипты оставшихся генов отсутствуют (*SWEET7a*) или присутствуют в следовых количествах (0.09–1.85) (рис. 2). В листьях тех же образцов высокий уровень транскриптов наблюдается для *SWEET12c* (25.18) и *10a* (41.51), и средний – для *SWEET1a* (12.58), *1e* (11.34) и *3* (5.11). Транскрипты генов *SWEET1b*, *7a*, *14* и *15* отсутствуют или присутствуют в следовых количествах (0.12–0.25) (рис. 2). В листьях дикорастущего вида *S. pimpinellifolium* количество транскриптов *SWEET* в ~ 1.4–7.3 раза ниже, чем в листьях сорта Heinz; в то же время транскрипты некоторых генов, имеющих высокий и средний уровень экспрессии у сорта Heinz, у *S. pimpinellifolium* не экспрессируются (*SWEET1b* и *14*) или детектируются в следовых количествах (*SWEET3* и *15*) (рис. 2).

Было обнаружено, что в бутонах и цветках томата сорта Heinz транскрибируются все анализируемые гены (рис. 2). В бутонах наибольший уровень транскриптов характерен для генов *SWEET1a* (117.16) и *15* (73.00), и относительно высокие значения – для генов *SWEET1b* (45.54), *12c* (43.07), *14* (24.86) и *7a* (24.65), тогда как гены *SWEET1e* (0.88) и *3* (1.00) имеют самую низкую активность. При этом в цветках на стадии антезиса уровень транскриптов генов *SWEET1a*, *1b*, *12c* и *14* сопоставим (15.68–18.97) и снижен в сравнении с экспрессией в бутонах в ~1.5–6.3 раза. Уровень транскриптов остальных анализируемых генов (1.68–8.72) в цветках падает (*SWEET7a* и *15*) или растет (*SWEET1e*, *3* и *10a*) в сравнении с экспрессией в бутонах (рис. 2).

В сравнении с цветком в образующихся плодах сорта Heinz количество транскриптов генов *SWEET1a*, *3*, *12c*, *14* и *15* снижается (в 56.1, 1.4, 86.2, 1.2 и 13.2 раза, соответственно), а генов *SWEET1b* и *7a* возрастает (в 1.7 и 7.3 раза, соответственно); транскрипты *SWEET1e* и *10a* отсутствуют (рис. 2).

По мере роста плода сорта Heinz до стадии MG (mature green, зеленый жесткий плод финального размера) существенно возрастает уровень транскриптов *SWEET12c* и *10a* (в ~170 и 2 раза, соответственно); активность *SWEET3*, *7a* и *15* снижается, *SWEET1b* растет и затем падает, а *SWEET1a* и *14* снижается и затем поднимается. В процессе созревания плода (от MG до биологической спелости) растет экспрессия *SWEET1a* и *15*; уровень транскриптов остальных генов падает до следо-

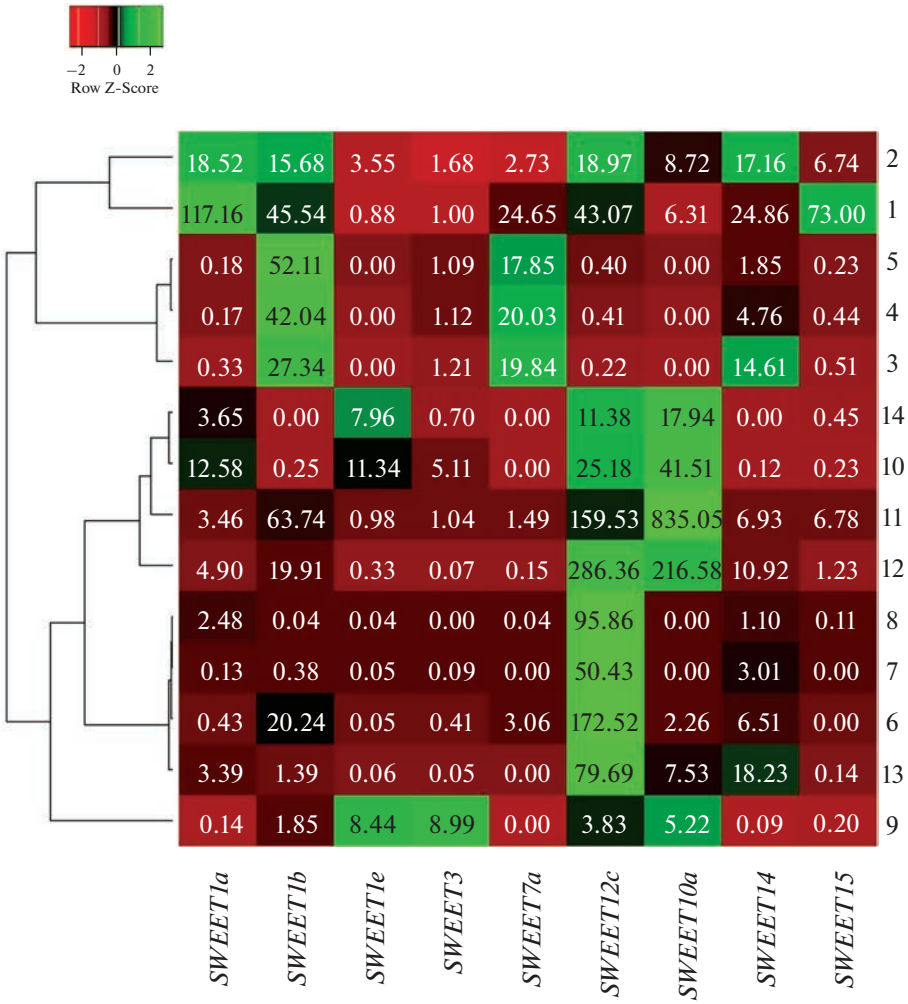


Рис. 2. Тепловая карта экспрессии генов *SWEET1a*, *SWEET1b*, *SWEET1e*, *SWEET3*, *SWEET7a*, *SWEET10a*, *SWEET12c*, *SWEET14* и *SWEET15* в различных органах *S. lycopersicum* сорт Heinz (1 – бутон, 2 – открытый цветок, 3 – плод диаметром 1 см, 4 –плод диаметром 2 см, 5 – плод диаметром 3 см, 6 – зеленый плод финального размера, 7 – зрелый плод на стадии смены окраски, 8 – биологически спелый плод, 9 – корень, 10 – лист) и *S. pimpinellifolium* (11 – незрелый зеленый плод, 12 – жесткий зеленый плод финального размера, 13 – мягкий зеленый плод финального размера, 14 – лист). Тепловая карта построена на основе анализа *in silico* транскриптомных данных (Tomato Functional Genomics), цифрами указаны значения RPKM для экспрессии генов.

вых количеств, кроме *SWEET12c* (снижение от 172.52 до 95.86 RPKM) (рис. 2).

В процессе созревания плода *S. pimpinellifolium* (от MG до биологической спелости) уровень транскриптов *SWEET12c*, как и у сорта Heinz, значителен и снижается (от 159.53 до 79.69 RPKM). Другие гены ведут себя сходным образом в сравнении с генами сорта Heinz, кроме *SWEET1e*, *10a* и *15* (уровень транскриптов падает в ~ 16, 111 и 48 раз, соответственно), а также *SWEET14* (уровень транскриптов повышается в ~2.6 раз) (рис. 2).

Таким образом, среди анализируемых генов были выявлены гены, наиболее активные в вегетативных органах растения томата сорта Heinz (*S. lycopersicum*). В корнях это *SWEET1e*, *3*, *10a* и *12c*, а в листьях – *SWEET1a*, *1e*, *3*, *10a* и *12c*. Важно отметить, что есть гены, экспрессия которых значительна в листьях сорта Heinz, но отсутствует (*SWEET1b* и *14*) или крайне низка (*SWEET15*) в листьях дикорастущего красноплодного вида *S. pimpinellifolium*. Кроме того, в листьях *S. pimpinellifolium* все анализируемые гены менее активны, чем у сорта Heinz. Репродуктивные ткани (бутоны и цветки) сорта Heinz характеризуются заметной активностью семи генов – *SWEET1a*, *1b*, *7a*, *10a*, *12c*, *14* и *15*. В сравнении с цветком, в плоде уровень транскриптов данных генов существенно падает (*SWEET1a*, *3*, *12c*, *14* и *15*) или повышается (*SWEET1b* и *7a*). Рост плода до стадии MG сопровождается значительным увеличением уровня транскриптов *SWEET12c* и *10a*, тогда как в процессе дальнейшего созревания плода (до биологической спелости) уровень транскриптов этих

генов снижается, и, одновременно, растет экспрессия *SWEET1a* и *15*. Созревание плода *S. pimpinellifolium* сопровождается сходной с сортовой динамикой экспрессии *SWEET12c* и существенными отличиями в случае генов *SWEET1e*, *10a*, *14* и *15*.

Наблюдаемая дифференциальная экспрессия генов при сравнении сорта Heinz (*S. lycopersicum*) и вида *S. pimpinellifolium* или же при сравнении различных тканей или стадий развития плода внутри образцов подтверждает правильность выбора данных генов для дальнейшего сравнительного анализа между сортами и видами томата.

Профиль экспрессии генов *SWEET* в спелом плоде образцов популяции *S. lycopersicum* × *S. pennellii*. Анализ экспрессии генов *SWEET* в спелом плоде *S. lycopersicum* (сорт M82) и 74 инбредных линий сорта M82, полученных от скрещивания с образцом *S. pennellii*, был проведен *in silico*.

В результате было выявлено, что гены *SWEET1e*, *3* и *7a* не экспрессируются ни в плоде сорта M82, ни в инбредных линиях. Транскрипты генов *SWEET10a* и *14* отсутствуют, или присутствуют в следовых количествах (за исключением двух линий из 74, где наблюдается существенный уровень транскриптов *SWEET10a* или *14*) (рис. 3). Относительно низкая активность характерна для гена *SWEET15* (0.08–10.19 RPKM), тогда как уровень транскриптов генов *SWEET1a* (2.52–56.83), *1b* (2.50–65.22) и *12c* (11.91–249.91) высок (относительно *SWEET15*) и имеет значительный разброс внутри популяции (рис. 3). В спелом плоде сорта M82 наиболее высокий уровень транскриптов наблюдается для генов *SWEET12c* (27.04) и *1a* (15.73), средний для *SWEET1b* (6.22) и низкий для *SWEET15* (1.12) (рис. 3).

Таким образом, среди анализируемых генов были выделены четыре – *SWEET12c*, *1a*, *1b* и *15*, имеющие существенный уровень транскриптов в спелом плоде инбредных линий, полученных в результате скрещивания красноплодного сорта M82 *S. lycopersicum* и дикорастущего зеленоплодного образца *S. pennellii*. Показано, что в инбредных линиях уровень транскриптов данных генов может быть как ниже, так и значительно выше сортового уровня (рис. 2, 3), что предполагает их важную роль в определении содержания и состава сахаров в плоде томата различных сортов и видов.

Уровень транскриптов генов *SWEET* в спелых плодах образцов видов томата. Уровень транскриптов генов *SWEET1a*, *1b*, *1e*, *3*, *7a*, *10a*, *12c*, *14* и *15* был определен в спелом плоде у образцов четырех видов томата – трех дикорастущих (*S. pennellii*, *S. habrochaites* и *S. cheesmaniae*) и культивируемого (*S. lycopersicum*, семь сортов).

Транскрипты гена *SWEET1e* не были обнаружены ни в одном анализируемом образце, как дикорастущих видов, так и сортов. В плодах зеленоплодного вида *S. habrochaites* выявлены транскрипты остальных восьми анализируемых генов. При этом наиболее высокий уровень экспрессии был показан для генов *SWEET10a* и *15*, другие гены экспрессировались примерно на 1–2 порядка ниже. Другие два дикорастущих вида характеризовались наличием в плодах мРНК *SWEET1b*, *10a*, *12c* и *14* (зеленоплодный *S. pennellii*), и *SWEET1a*, *1b*, *7a* и *10a* (желтоплодный *S. cheesmaniae*). Таким образом, общим для всех трех дикорастущих видов оказалось присутствие мРНК двух генов – *SWEET1b* и *10a* (рис. 4).

В плодах сортов культивируемого вида *S. lycopersicum* транскрипты *SWEET1a* и *12c* присутствовали у всех образцов, за исключением *SWEET12c* у белоплодного сорта White Beauty. Наиболее высокий уровень транскриптов *SWEET1a* наблюдался у красноплодных сортов Heinz и Самохвал, тогда как *SWEET12c* – только у сорта Heinz. Плоды двух сортов отличались от 5 остальных сортов наличием транскриптов *SWEET14* и *15* (сорт Heinz, красные плоды) и *SWEET7a* (сорт Black Jack, красно-коричневые плоды) (рис. 4). Таким образом, за редким исключением, гены *SWEET1a* и *12c* в разной степени активны в спелых плодах и дикорастущих видов, и сортов *S. lycopersicum*. В то же время, дифференциальная экспрессия остальных шести генов (вплоть до ее отсутствия) может быть одной из причин межвидовых различий в транспорте сахаров и, следовательно, качественных признаках плода.

Содержание сахарозы, глюкозы и фруктозы в спелых плодах образцов видов томата. В тканях спелого плода тех же образцов видов и сортов томата было определено содержание сахарозы, глюкозы и фруктозы (табл. 1). Показано, что только плоды дикорастущих видов *S. pennellii* и *S. habrochaites*, имеющие зеленую окраску, содержат значительное количество сахарозы, сопоставимое как с уровнем глюкозы, так и с уровнем фруктозы (табл. 1). Плоды *S. cheesmaniae*, а также сортов White Beauty, Самохвал, Heinz и Long John, имеющие окраску, отличную от зеленой (рис. 1), сахарозы не содержали. В плодах остальных анализируемых сортов *S. lycopersicum* (оттенки красного; рис. 1) сахароза присутствовала в малых или следовых количествах (табл. 1).

Для образцов *S. lycopersicum* и *S. cheesmaniae* было характерно высокое содержание глюкозы и фруктозы (каждой гексозы в ~3–30 раз больше, чем сахарозы). В сопоставлении с *S. pennellii* и *S. habrochaites* количество каждого моносахарида в плодах анализируемых образцов накапливалось больше в ~3.0–9.4 и ~1.4–4.2 раза, соответственно (табл. 1).

Для каждого анализируемого образца было сопоставлено содержание фруктозы и глюкозы. В результате выявлено, что соотношение данных

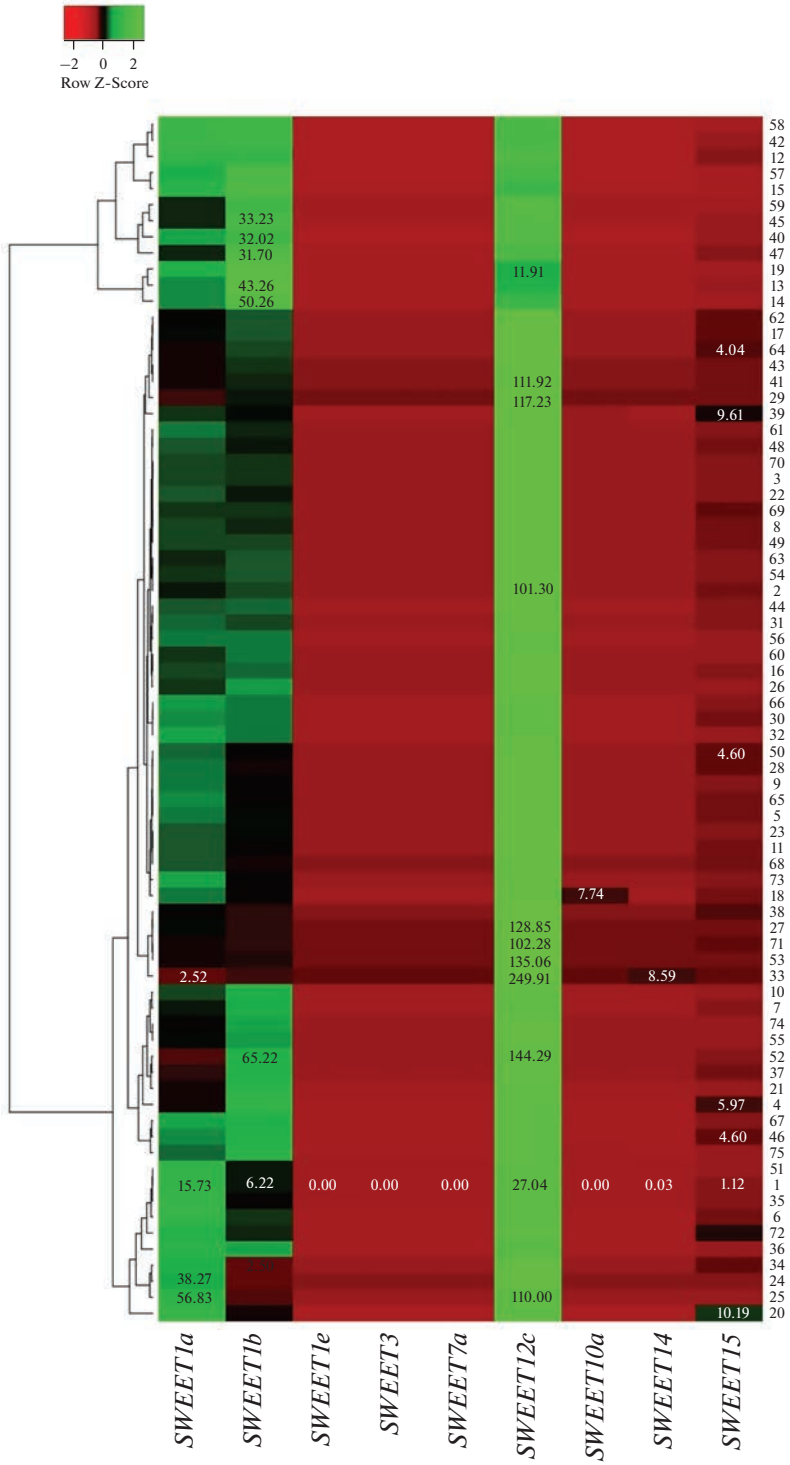


Рис. 3. Тепловая карта экспрессии генов *SWEET1a*, *SWEET1b*, *SWEET1e*, *SWEET3*, *SWEET7a*, *SWEET10a*, *SWEET12c*, *SWEET14* и *SWEET15* в спелом плоде сорта *S. lycopersicum* сорт M82 (1) и инбредных линий *S. lycopersicum* сорт M82 × *S. pennellii* LA0716 (2–75). Тепловая карта построена на основе анализа *in silico* транскриптомных данных (Tomato Functional Genomics). Указаны значения RPKM для экспрессии генов у сорта M83, а также наибольшие и минимальное значение RPKM для генов *SWEET1a*, *SWEET1b*, *SWEET12c* и *SWEET15*. Значения RPKM для генов *SWEET1e*, *SWEET3*, *SWEET7a*, *SWEET10a* и *SWEET14* составили 0.00, 0.00, 0.00, 0.00–0.35 (исключение – 7.74 у линии 18) и 0.00–0.24 (исключение – 8.59 у линии 33) соответственно.

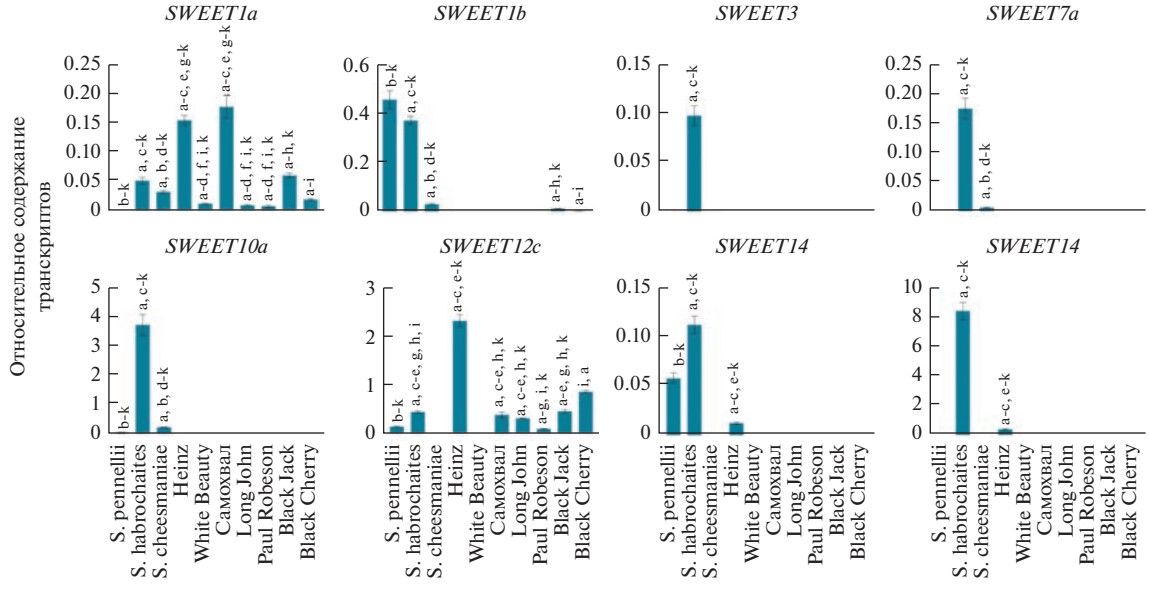


Рис. 4. Профиль экспрессии генов *SWEET1a*, *SWEET1b*, *SWEET1e*, *SWEET3*, *SWEET7a*, *SWEET10a*, *SWEET12c*, *SWEET14* и *SWEET15* в спелом плоде дикорастущих видов томата (*S. pennellii* LA0716, *S. habrochaites* LA2144 и *S. cheesmaniae* LA0421) и культивируемого вида *S. lycopersicum* (сорта Heinz, White Beauty, Самохвал, Long John, Paul Robeson, Black Jack и Black Cherry). Буквами a–k обозначена существенная ($P > 0.01$) разница в уровне транскриптов между образцами.

гексоз эквимолярно (фруктоза : глюкоза = 0.98–1.10) у большинства анализируемых образцов (и сортов, и видов), за исключением сортов Black Jack и White Beauty, в спелых плодах которых количество фруктозы оказалось выше количества глюкозы на ~10–25% (фруктоза : глюкоза > 1.10) (табл. 1).

Проведенная оценка возможных корреляций между уровнем транскриптов проанализированных генов *SWEET* и соотношением гексоз показала отсутствие какой-либо связи между данными параметрами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Томат *S. lycopersicum*, представляя собой одну из самых важных сельскохозяйственных культур, одновременно является моделью для изучения созревания сочного плода. Как селекции томата, так и научным исследованиям способствует наличие дикорастущих родственных видов, поскольку отдаленная гибридизация позволяет интрогрессировать в линии и сорта томата ценные признаки – от устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессам до измененных и даже новых качеств урожая [29]. Одной из ключевых целевых характеристик томата является вкус плода, который определяется, в частности, содержанием и соотношением сахаров [30]. Кроме вкусовых вариаций, качество и количество сахаров оказывает также не менее значимое влияние на интенсивность различных метаболических путей [31, 32].

В развитии плода томата выделяют стадии активного деления клеток завязи после оплодотворения, быстрого роста (расширение плода за счет увеличения клеток), медленного роста (созревание, когда происходят значительные метаболические изменения) и биологической спелости. Процесс сопровождается постоянным экспортом сахарозы в клетки запасающей паренхимы из ситовидных клеток через апопласт [27]. Для этого используется локализованный в плазматической мембране механизм транспорта сахаров с помощью белков-транспортеров, специфичных для сахарозы и/или отдельных гексоз [14–16, 33], который считается основным фактором урожайности.

Целью настоящего исследования стал сравнительный анализ экспрессии генов унипортеров сахаров семейства SWEET в спелом плоде томата. Гены *SWEET1a*, *1b*, *1e*, *3*, *7a*, *10a*, *12c*, *14*, и *15* были выбраны из всего семейства на основе опубликованных данных, касающихся идентификации и классификации генов *SWEET S. lycopersicum* [15, 22], анализа их экспрессии у сортов томата [22, 26, 27] и показанного участия аллеля *SWEET1a* в увеличении соотношения фруктоза : глюкоза в плодах [9, 10].

Для исследования мы использовали образцы томата четырех видов, включая различные сорта *S. lycopersicum* и три дикорастущих родственных вида *S. pennellii*, *S. habrochaites* (древние виды) и *S. cheesmaniae* (эволюционно сравнительно молодой вид). Выбор был основан на связи окраски плода с составом растворимых сахаров, а именно

том явлении, что спелые плоды зеленоплодных видов томата накапливают преимущественно сахарозу, тогда как для желто-красных плодов это редуцирующие сахара – фруктоза и глюкоза. Таким образом, отобранные нами образцы различались окраской спелого плода: зеленая у *S. pennellii* и *S. habrochaites*, белая у сорта White Beauty, желтая у *S. cheesmaniae* и сорта Самохвал и оттенки красного в случае остальных сортов (рис. 1).

С учетом известной углеводной специфичности унипортеров SWEET [14–16], анализируемые нами гены, предположительно, участвуют в переносе гексоз (гены клады I *SWEET1a*, *1b*, *1e* и *3*, а также ген клады II *SWEET7a*) и сахарозы (гены клады III *SWEET10a*, *12c*, *14* и *15*). Из этого следует, что активность первых может оказывать влияние на количество и соотношение гексоз, а последних – на содержание сахарозы (в том числе, в качестве источника гексоз) в спелом плоде. В виду известного участия аллеля *SWEET1a S. habrochaites* LA1777 в регуляции соотношения гексоз в плоде [9, 10], для анализа был использован другой образец (LA2144) вида *S. habrochaites*.

Проведенный *in silico* анализ экспрессии отобранных генов в красноплодных образцах томата сорта Heinz (*S. lycopersicum*) и дикорастущего вида *S. pimpinellifolium* (рис. 2) позволил определить гены, которые наиболее активны в процессе роста и созревания плода, а также те, которые ассоциированы с различиями между видами. Судя по значительной активности генов *SWEET1a*, *1b*, *7a*, *10a*, *12c*, *14* и *15* в бутонах и цветках сорта Heinz, регуляция содержания сахаров в плоде начинается задолго до оплодотворения семязачатков и связана не только с завязью (будущим плодом), но и с развитием зародышей, как это показано, к примеру, для *SWEET15* [27].

Данные проведенного анализа (рис. 2) подтвердили, что среди генов *SWEET* в плоде активны *SlSWEET3*, *7a*, *14*, *15*, *12c* и *10a*, что показано ранее на примере сортов Micro-Tom и Heinz и вида *S. pimpinellifolium* [22, 26, 27]. Однако высокий уровень транскриптов *SlSWEET1e*, полученный ранее [22, 26, 27], не согласуется с данными нашего анализа: транскрипты гена в спелом плоде не были выявлены ни у вида, ни у сорта (рис. 2).

Сходный профиль экспрессии и значительная при развитии плода активность генов *SWEET12c* и *1b* предполагает консервативность их функции в транспорте сахарозы и гексоз, соответственно, как минимум, на последних этапах эволюции видов томата. В отличие от сорта Heinz плоды *S. pimpinellifolium* характеризовались существенно более высокими уровнями транскриптов *SWEET10a* и *14* (транспорт сахарозы) и низким уровнем *SWEET7a* (транспорт гексоз) (рис. 2). Это говорит о том, что даже у эволюционно и морфологически самого близкого к *S. lycopersicum* вида томата (*S. pimpinellifolium*) имеются отличия в регуляции переноса сахаров в плоде. Возможно, это является отражением эволюции плодоспецифичного механизма транспорта сахаров, тогда как в листе, с учетом сходного между образцами профиля экспрессии анализируемых генов (рис. 2), вероятные изменения не так значимы.

Дальнейший сравнительный *in silico* анализ экспрессии генов *SWEET* в спелом плоде сорта M82 *S. lycopersicum* и 74 инбредных линий, полученных в результате скрещивания красноплодного сорта M82 и дикорастущего зеленоплодного образца *S. pennellii* [34], выявил значительные уровни транскриптов *SWEET1a*, *1b*, *12c* и *15*. Существенные колебания этих уровней между инбредными линиями (рис. 3) предполагают важную, зависимую от генотипа роль данных четырех унипортеров в определении содержания и состава сахаров в плоде томата различных сортов и видов. При этом выдвинутое ранее предположение (на основании тандемной локализации и высокой идентичности аминокислотных последовательностей) о сходных транспортных свойствах SlSWEET1a и 1b в гомеостазе гексоз во время созревания плода [9] не коррелирует с существенными различиями в уровне транскриптов данных генов в спелом плоде у образцов линий (рис. 3). Тем не менее, данные унипортеры могут действовать совместно, дополняя друг друга или же дублируя функцию при переносе гексоз.

Анализ экспрессии *SWEET* с помощью ПЦР-РВ показал, что за редким исключением, гены *SWEET1a* и *12c* в разной степени активны в спелых плодах, как у дикорастущих видов, так и у сортов томата (рис. 4), что подтверждает консервативность их функции в процессе эволюции видов томата. Поскольку аллель *FgrH* (*SWEET1a*), сцепленный с увеличением соотношения фруктоза : глюкоза в спелом плоде, является специфичным для *S. habrochaites* LA1777 [9, 10], дифференциальная экспрессия остальных шести генов как одна из причин различий в транспорте сахаров и качественных признаков плода между видами влияет, вероятно, на количество гексоз/сахарозы, но не на соотношение гексоз.

Проведенная оценка возможных корреляций между уровнем транскриптов генов *SWEET* и соотношением фруктоза : глюкоза в спелых плодах выявила отсутствие какой-либо связи между данными параметрами. В том числе, это касается уровня транскриптов *SWEET1a*, для которого ранее показано соответствие между повышенной экспрессией гена и изменением соотношения гексоз в плоде [11]. Изменение соотношения гексоз ($Ф : Г > 1.10$) у сортов Black Jack и White Beauty (табл. 1) может означать вероятное присутствие в родословной данных сортов интрогрессии из *S. habrochaites* LA1777 [10] или же наличие особен-

ностей генотип-специфичной регуляции под воздействием совокупности генов *SWEET*.

Таким образом, в данной работе было проведено сравнение профиля экспрессии генов *SWEET1a*, *1b*, *1e*, *3*, *7a*, *10a*, *12c*, *14* и *15* в растениях томата. Результаты, полученные при сравнении сорта Heinz и *S. pimpinellifolium*, позволили определить сходство и различия в профиле экспрессии данных генов между культивируемым и дикорастущим красноплодными видами. Анализ экспрессии генов в спелом плоде сорта M82 в сравнении с 74 инбредными линиями M82 × *S. pennellii* продемонстрировал влияние интрогрессии генетического материала дикорастущего вида в сорт на разброс экспрессионных данных между инбредными линиями, что является перспективным для селекции томата с улучшенными вкусовыми качествами плода. ПЦР-РВ анализ экспрессии генов *SWEET* в спелом плоде видов томата, различающихся содержанием сахаров в плоде, эволюционным возрастом и окраской плода (*S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae* и *S. lycopersicum*), выявил гены, специфично активные в дикорастущих видах, а также 2 гена – *SWEET1a* и *12c*, функция которых предположительно консервативна между всеми анализируемыми образцами. Сопоставление экспрессионных данных с показателями биохимического анализа содержания сахарозы, глюкозы и фруктозы корреляций не выявило. В целом, было показано, что каждый образец томата имеет свой специфичный профиль экспрессии девяти генов *SWEET*, что предполагает существование особенностей механизма транспорта сахаров в плоде томата для каждого отдельного генотипа. Полученные результаты будут способствовать углубленному пониманию роли унипортеров SWEET в определении содержания и соотношения растворимых сахаров в спелом плоде, что может быть использовано в селекции томата с улучшенными вкусовыми качествами плода.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 19–16–00016) и Министерства науки и высшего образования РФ.

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. *Yoon J., Cho L.H., Tun W., Jeon J.S., An G.* Sucrose signaling in higher plants // Plant Sci. 2021. V. 302: 110703. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110703
2. *Sami F., Siddiqui H., Hayat S.* Interaction of glucose and phytohormone signaling in plants // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 135. P. 119. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.11.005
3. *Ji Y., Nuñez Ocaña D., Choe D., Larsen D.H., Marcelis L.F.M., Heuvelink E.* Far-red radiation stimulates dry mass partitioning to fruits by increasing fruit sink strength in tomato // New Phytol. 2020. V. 228. P. 1914. https://doi.org/10.1111/nph.16805
4. *Zhang Z., Zou L., Ren C., Ren F., Wang Y., Fan P., Li S., Liang Z.* VvSWEET10 mediates sugar accumulation in grapes // Genes (Basel). 2019. V. 10: 255. https://doi.org/10.3390/genes10040255
5. *Peralta I.E., Spooner D.M.* Granule-bound starch synthase (*GBSSI*) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section Lycopersicon [Mill.] Wettst. subsection Lycopersicon) // Am. J. Bot. 2001. V. 88. P. 1888.
6. *Davies J.N.* Occurrence of sucrose in the fruit of some species of Lycopersicon // Nature. 1966. V. 209. P. 640. https://doi.org/10.1038/209640a0
7. *Miron D., Schaffer A.A.* Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. and Bonpl. // Plant Physiol. 1991. V. 95. P. 623. https://doi.org/10.1104/pp.95.2.623
8. *Beckles D.M., Hong N., Stamova L., Luengwilai K.* Biochemical factors contributing to tomato fruit sugar content: a review // Fruits. 2012. V. 67. P. 49. https://doi.org/10.1051/fruits/2011066
9. *Shammai A., Petreikov M., Yeselson Y., Faigenboim A., Moy-Komemi M., Cohen S., Cohen D., Besaulov E., Efrati A., Houminer N., Bar M., Ast T., Schuldiner M., Klemens P.A.W., Neuhaus E. et al* Natural genetic variation for expression of a SWEET transporter among wild species of *Solanum lycopersicum* (tomato) determines the hexose composition of ripening tomato fruit // Plant J. 2018. V. 96. P. 343. https://doi.org/10.1111/tpj.14035
10. *Levin I., Gilboa N., Yeselson E., Shen S., Schaffer A.A. Fgr*, a major locus that modulates fructose to glucose ratio in mature tomato fruit // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. P. 256. https://doi.org/10.1007/s001220050034
11. *Ho L.H., Klemens P.A.W., Neuhaus H.E., Ko H.Y., Hsieh S.Y., Guo W.J.* SlSWEET1a is involved in glucose import to young leaves in tomato plants // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 3241. https://doi.org/10.1093/jxb/erz154
12. *Julius B.T., Leach K.A., Tran T.M., Mertz R.A., Braun D.M.* Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries // Plant Cell Physiol. 2017. V. 58. P. 1442. https://doi.org/10.1093/pcp/pcx090.
13. *Chen L.Q.* SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition // New Phytol. 2014. V. 201. P. 1150. https://doi.org/10.1111/nph.12445
14. *Chen L.-Q., Qu X.-Q., Hou B.-H., Sosso D., Osorio S., Fernie A.R., Frommer W.B.* Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport // Science. 2012. V. 335. P. 207. https://doi.org/10.1126/science.1213351
15. *Patil G., Valliyodan B., Deshmukh R., Prince S., Nicander B., Zhao M., Sonah H., Song L., Lin L., Chaudhary J., Liu Y., Joshi T., Xu D., Nguyen H.T.* Soybean (*Glycine max*) *SWEET* gene family: insights through compara-

tive genomics, transcriptome profiling and whole genome re-sequence analysis // BMC Genomics. 2015. V. 16: 520.
https://doi.org/10.1186/s12864-015-1730-y

16. *Klemens P.A., Patzke K., Deitmer J., Spinner L., Le Hir R., Bellini C., Bedu M., Chardon F., Krapp A., Neuhaus H.E.* Overexpression of the vacuolar sugar carrier *AtSWEET16* modifies germination, growth, and stress tolerance in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2013. V. 163. P. 1338.
https://doi.org/10.1104/pp.113.224972
17. *Chen L.Q., Hou B.H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M.L., Qu X.Q., Guo W.J., Kim J.G., Underwood W., Chaudhuri B., Chermak D., Antony G., White F.F., Somerville S.C., Mudgett M.B. et al.* Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens // Nature 2010. V. 468. P. 527.
https://doi.org/10.1038/nature09606
18. *Eom J.S., Chen L.Q., Sosso D., Julius B.T., Lin I.W., Qu X.Q., Braun D.M., Frommer W.B.* SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 25. P. 53.
https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.005
19. *Isoda R., Palmai Z., Yoshinari A., Chen L.Q., Tama F., Frommer W.B., Nakamura M.* SWEET13 transport of sucrose, but not gibberellin, restores male fertility in *Arabidopsis sweet13; 14* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2022. V. 119: e2207558119.
https://doi.org/10.1073/pnas.2207558119
20. *Chen H.Y., Huh J.H., Yu Y.C., Ho L.H., Chen L.Q., Tholl D., Frommer W.B., Guo W.J.* The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection // Plant J. 2015. V. 83. P. 1046.
https://doi.org/10.1111/tpj.12948
21. *Valifard M., Le Hir R., Müller J., Scheuring D., Neuhaus H.E., Pommerrenig B.* Vacuolar fructose transporter SWEET17 is critical for root development and drought tolerance // Plant Physiol. 2021. V. 187. P. 2716.
https://doi.org/10.1093/plphys/kiab436
22. *Feng C.Y., Han J.X., Han X.X., Jiang J.* Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the *SWEET* gene family in tomato // Gene. 2015. V. 573. P. 261.
https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.055
23. *Wang J., Yu Y.C., Li Y., Chen L.Q.* Hexose transporter SWEET5 confers galactose sensitivity to *Arabidopsis* pollen germination via a galactokinase // Plant Physiol. 2022. V. 189. P. 388.
https://doi.org/10.1093/plphys/kiac068
24. *Lin I., Sosso D., Chen L.Q., Gase K., Kim S.G., Kessler D., Klinkenberg P.M., Gorder M.K., Hou B.H., Qu X.Q., Carter C.J., Baldwin I.T., Frommer W.B.* Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9 // Nature. 2014. V. 508. P. 546.
https://doi.org/10.1038/nature13082
25. *Chen L.Q., Lin I.W., Qu X.Q., Sosso D., McFarlane H.E., Londoño A., Samuels A.L., Frommer W.B.* A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo // Plant Cell. 2015. V. 27. P. 607.
https://doi.org/10.1105/tpc.114.134585
26. *Zhang X., Feng C., Wang M., Li T., Liu X., Jiang J.* Plasma membrane-localized SlSWEET7a and SlSWEET14 regulate sugar transport and storage in tomato fruits // Hortic. Res. 2021. V. 8: 186.
https://doi.org/10.1038/s41438-021-00624-w
27. *Ko H.Y., Ho L.H., Neuhaus H.E., Guo W.J.* Transporter SlSWEET15 unloads sucrose from phloem and seed coat for fruit and seed development in tomato // Plant Physiol. 2021. V. 187. P. 2230.
https://doi.org/10.1093/plphys/kiab290
28. *Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z.* Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section Lycopersicon) // Plants. 2020. V. 9: 1169.
https://doi.org/10.3390/plants9091169
29. *Fortuny A.P., Bueno R.A., Pereira da Costa J.H., Zanor M.I., Rodríguez G.R.* Tomato fruit quality traits and metabolite content are affected by reciprocal crosses and heterosis // J. Exp. Bot. 2021. V. 72. P. 5407.
https://doi.org/10.1093/jxb/erab222
30. *Klee H.J., Giovannoni J.J.* Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes // Annu. Rev. Genet. 2011. V. 45. P. 41.
https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132507
31. *Jia H., Jiu S., Zhang C., Wang C., Tariq P., Liu Z., Wang B., Cui L., Fang J.* Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor // Plant Biotechnol. J. 2016. V. 14. P. 2045.
https://doi.org/10.1111/pbi.12563
32. *De Rocchis V., Jammer A., Camehl I., Franken P., Roitsch T.* Tomato growth promotion by the fungal endophytes *Serendipita indica* and *Serendipita herbamans* is associated with sucrose de-novo synthesis in roots and differential local and systemic effects on carbohydrate metabolisms and gene expression // J. Plant Physiol. 2022. V. 276: 153755.
https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153755
33. *Cai Y., Yin L., Tu W., Deng Z., Yan J., Dong W., Gao H., Xu J., Zhang N., Wang J., Zhu L., Meng Q., Zhang Y.* Ectopic Expression of *VvSUC27* Induces Stenospermocarpy and Sugar Accumulation in Tomato Fruits // Front. Plant Sci. 2021. V. 12: 759047.
https://doi.org/10.3389/fpls.2021.759047
34. *Eshed Y., Abu-Abied M., Saranga Y., Zamir D. Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii* // Theor. Appl. Genet. 1992. V. 83. P. 1027.
https://doi.org/10.1007/BF00232968

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 365–371

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

ИЗОЛЯЦИЯ *CP-PVY*-СПЕЦИФИЧНЫХ *siRNA* ИЗ *PVY*-ИНФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ *Solanum tuberosum*

© 2023 г. М. Ю. Сутула[a], *, Ж. К. Кабатаева[a], Г. К. Комекова[a], Т. С. Хоснутдинова[a], Е. А. Жакманова[a]

[a] *Некоммерческое акционерное общество "Восточно-Казахстанский университет имени Сарсена Аманжолова", Усть-Каменогорск, Казахстан*

**e-mail: max.sutula@gmail.com*

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.
После доработки 13.12.2022 г.
Принята к публикации 15.12.2022 г.

Инструменты для активации резистентности сельскохозяйственных культур к вирусам в настоящее время становятся частью комплексной стратегии защиты растений. Искусственная устойчивость к вирусам посредством экспрессии белка оболочки вируса в трансгенных растениях довольно хорошо изучена. Актуальным вопросом является изучение малых РНК, вовлеченных в защитные механизмы РНК-интерференции против вирусов. Понимание роли коротких интерферирующих РНК (siRNA) в регуляции и выключении генов имеет важное значение. Вспомогательный компонент протеиназы (HC-Pro) – мультифункциональный супрессорный белок, синтезируемый вирусом картофеля *Y*, способен нейтрализовать защиту растений *S. tuberosum* путем захвата siRNA и выведения их из процесса РНК-интерференции, тем самым вызывая системное заражение растения-хозяина. Жидкостная хроматография белков в сочетании с высокоэффективным секвенированием может помочь в распознавании большого количества малых РНК, образующихся в результате деградации вирусной РНК, и идентифицировать 21–23 п.н. siRNA из PVY-инфицированных растений *S. tuberosum*. Нуклеопротеиновый комплекс HC-Pro/siRNA обнаружен в хроматографических фракциях с помощью антител против HC-Pro, Southern-blot указывал на наличие малых РНК в комплексе, а анализ данных глубокого секвенирования популяции малых РНК определил специфичность 21–23 п.н. siRNA к белку оболочки вируса PVY. Результаты исследований могут быть применимы в изучении внутриклеточных сигнальных молекул и стимулировать новые исследования противовирусных механизмов для разработки эффективных стратегий защиты растений от вирусов.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum L.*, вирусы, выделение siRNA, PVY, sRNA

DOI: 10.31857/S0015330322600711, **EDN:** IBNXFM

ВВЕДЕНИЕ

Фитопатогенные вирусы наносят огромный ущерб сельскому хозяйству и экономике [1]. Из-за распространения вирусов картофеля потери урожая могут достигать 60% [2]. Существующие методы борьбы с вирусами сводятся к получению безвирусного семенного материала и своевременной диагностике вирусных инфекций. Однако работа по контролю вирусных инфекций осложняется тем, что каждый сезон появляется новый вирусный штамм, а патогенез вирусной инфекции длительное время протекает в скрытой форме. В связи с этим, особенно актуальны работы по разработке актуальных стратегий борьбы с вирусами и созданию устойчивых линий растений.

Одним из потенциальных инструментов повышения устойчивости растений к вирусам является РНК-интерференция (RNA-i) [3]. Существенной особенностью защитного механизма РНК-интерференции является наличие коротких двуцепочечных интерферирующих РНК длиной 21–23 нуклеотид, которые являются мощными модуляторами РНК-интерференции [4, 5]. При запуске процесса RNA-i, двуцепочечная РНК вируса (dsRNA) с помощью фермента DISER (рибонуклеаза из семейства РНКазы III) фрагментируется на комплементарные вирусной РНК короткие интерферирующие РНК, которые в дальнейшем вовлекаются в эндорибонуклеазный эффекторный комплекс RISC (RNA-induced silencing complex) и напрямую участвуют в распознавании и последующей деградации вирусных РНК-мишеней [6, 7]. Исследователи продемонстрировали, как используя феномен защитной РНК-интерференции можно придать значительную устойчивость к вирусам путем создания генетически модифицированных растений [8]. В нашей работе наглядно показан принципиально новый методо-

логический подход изоляции специфичных к белку оболочки вируса PVY (coat protein, CP) 21–23 п.н. siRNA из PVY-инфицированных растений [9].

Вирусы из рода *Potyviridae* кодируют супрессорный белок HC-Pro (Helper component-proteinase), который является многофункциональным вирусным белком и принимает участие в таких важных процессах, как репликация вируса, системное и межклеточное распространение вирусных частиц [10]. Наиболее важной биологической функцией HC-Pro является его участие в подавлении защитных механизмов RNA-i, в частности, в захвате и удержании коротких 21–23 п.н. молекул siRNA, необходимых для успешной активации защитных механизмов RNA-i. Детальные биохимические исследования HC-Pro показали, что его способность образовывать димеры и мультимеры имеет принципиально важное значение для функционирования в качестве супрессора RNA-i. Исследователи определили функциональную роль сайта FRNK в структуре белка HC-Pro и показали, что эта функция напрямую влияет на селективное связывание siRNA и интенсивность проявления симптомов вирусного заболевания [11]. Кроме того, супрессорная функция HC-Pro также может быть связана со снижением стабильности siRNA, поскольку трансгенная экспрессия белка приводит к значительному снижению 5'-концевой модификации вирусных 21-нуклеотидных siRNA. Также, было обнаружено, что HC-Pro ингибирует функциональное метилирование siRNA и связывание siRNA с эффекторным комплексом RISC [12].

Поскольку структурные и биохимические характеристики супрессорного белка HC-Pro играют решающую роль в обнаружении и стабилизации siRNA на поверхности субъединиц супрессорного белка HC-Pro, образовавшийся комплекс HC-Pro/siRNA в PVY-инфицированных растениях может послужить источником вирус-специфичных коротких интерферирующих РНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали растения картофеля (*Solanum tuberosum L.*), семейство Пасленовые (*Solanaceae*), сорта Изольда и Таврия (класс Элита).

Растения выращивали на жидкой питательной МС-среде [13] в специальной вегетационной камере при влажности воздуха 85%, температуре 19–20°C и 16-часовом световом периоде. После выращивания в ростовой камере, микрорастения были высажены на территории сада Восточно-Казахстанской сельскохозяйственной опытной станции (GPS: N50.03324°, E82.53346°). В каждом эксперименте использовали 60 растений каждого сорта и проводили 3 биологические повторности в одинаковых условиях.

ELISA и RT-PCR диагностика

Диагностику инфекционных заболеваний картофеля (PVY, PVS, PVM, PVX, PLRV) проводили по протоколу коммерческого тест-набора сендвич-варианта ELISA Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха”, Россия. Результаты проведения анализа учитывали на спектрофотометре Multiskan FC (“Thermo Scientific”, США) при длине волны 492 нм.

Нуклеиновые кислоты из растительного материала экстрагировали с помощью коммерческого набора М-СОРБ (“Синтол”, Россия) с использованием магнитных частиц. Одностадийную реакцию обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили с использованием коммерческого набора реагентов (“Синтол”, Россия) на ПЦР-анализаторе АНК-32 (“Синтол”, Россия). Образцы проверяли на наличие вирусов PVY, PVS, PVM, PVX, PLRV.

Фракционирование комплекса HC-Pro/siRNA методом колоночной гель фильтрации

Для проведения жидкостной хроматографии белков (Fast protein liquid chromatography, FPLC) 6 г свежего листового материала зараженных вирусом PVY растений *S. tuberosum*, замораживали жидким азотом (–196°C) и растирали пестиком в фарфоровой ступке до гомогенной массы. К полученному гомогенату добавляли экстракционный буфер в объеме 1 мл (200 мМ Трис-HCl, pH 7.4). Экстракты фильтровали и центрифугировали в течение 15 мин при 12000 *g* и 4°C. Супернатант загружали на колонку (объем 150 мл, длиной 0.2 м) и фракционировали на FPLC-установке AKTA pure 25 (“GE Healthcare”, США) через колонку с сефакрилом S-200 (“Sigma”, США) со скоростью 50 мл/ч. В качестве подвижной фазы использовали буфер 100 мМ Tris-HCl (pH 7.5). Анализ концентрации белков в элюате проводили при длине волны A280 нм. С помощью декстрана – 1000 кДа (“Sigma”, США) определяли свободный объем колонки V_0 = 14 мл. Калибровку проводили с использованием маркерных белков: алкогольдегидрогеназа – 150 кДа, бычий сывороточный альбумин – 68 кДа, карбоангидраза – 40 кДа и цитохром – 12 кДа. (“Sigma”, США). Фракции объемом 1.5 мл собирали с помощью автоматического коллектора с последующим переносом на лед [14].

Выделение и очистка комплекса HC-Pro/siRNA

Комплекс HC-Pro/siRNA из фракций очищали с помощью anti-rabbit Protein-G агарозы, согласно прилагаемой к коммерческому набору методике (“Thermo Scientific”, США). Фракции смешивали с антителами (anti-rabbit) и инкубировали 12 ч при 4°C. Затем в каждую пробирку прилива-

ли по 30 мкл Protein-G и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После инкубации к смеси добавляли 500 мкл буфера для иммунопреципитации, центрифугировали в течение 3 мин и удаляли супернатант. Этап осаждения повторяли троекратно. Иммунный комплекс выделяли путем добавления 50 мкл буфера для эллюции, инкубации 5 мин и центрифугирования при 2500 *g* в течение 3 мин.

Изоляция siRNA

Нуклеиновые кислоты из хроматографических фракций, содержащих комплекс HC-Pro/siRNA, выделяли модифицированным методом с использованием стабилизированного раствора фенола и TRI-реагента ("Sigma", США) [15]. Образцы последовательно смешивали с TRI-реагентом, хлороформом, изопропанолом (99.9%), этанолом (70%) и поэтапно выдерживали 5 мин при комнатной температуре с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 12000 *g* и 4°C. Осадок высушивали на льду и разбавляли MilliQ-дистиллированной водой, свободной от ферментов.

Концентрацию РНК определяли на спектральном анализаторе NanoDrop 2000c ("Thermo Scientific", США) при длине волны A260 нм. Чистоту препарата анализировали в соотношении оптической плотности при длинах волн A260/280 нм.

Секвенирование коротких интерферирующих РНК

Образцы sRNA подготавливали к высокоэффективному секвенированию (HTS) по протоколу Illumina ("Illumina Inc.", США). sRNA лигировали с 3'- и 5'-адаптером. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 10 мкл образцов РНК и обратной транскриптазы SuperScript III ("Invitrogen Corp.", США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для амплификации. После амплификации ДНК фракционировали в 8% полиакриламидном геле при 200 В в течение 40 мин и тестировали на чипе Agilent 2100 Bioanalyzer ("Agilent Technologies Inc.", США). Полученную библиотеку кластеризовали и секвенировали с помощью анализатора генома Illumina IIx ("Illumina Inc.", США) в соответствии с инструкцией производителя в течение 35 циклов.

Данные секвенирования проверяли на соответствие и сортировали по распространенности. Дублирующиеся последовательности были удалены. Из оставшихся последовательностей были отобраны 100 наиболее часто встречающихся последовательностей и проанализированы путем сравнения с нуклеиновой последовательностью coat protein PVY в BLASTN на идентичность с использованием алфавитной сортировки и таксонометрической идентификации для *Solanum*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Использование PVY-инфицированных растений в качестве источника специфичных к вирусу коротких интерферирующих РНК

Как известно, одной из основных функций супрессорного белка HC-Pro является размер-специфичный захват и фиксация sRNA на поверхности субъединиц белка [16]. Мы обнаружили в клеточных экстрактах PVY-инфицированных растений картофеля специфичные к вирусу короткие интерферирующие РНК, связанные с HC-Pro. Вирус-специфичные siRNA были получены путем очистки и диссоциации комплекса HC-Pro/siRNA из тканей растений, инфицированных PVY. С целью предотвращения контаминации образцов другими вирусами картофеля, нами была проведена комбинированная диагностика экспериментальных растений на наличие распространенных в Казахстане вирусов данной культуры.

По результатам диагностики ELISA и RT-PCR были отобраны образцы растений с подтвержденной моноинфекцией PVY: Изольда 2, Изольда 3, Изольда 5, Таврия 2, Таврия 5 (табл. 1). Экстракты растительного материала PVY-инфицированных образцов картофеля были фракционированы методом гель-фильтрационной хроматографии на колонке с сефакрилом S-200. Данная матрица была выбрана, поскольку разрешающая способность сефакрила S-200 позволяет эффективно разделять белки с мол. м. до 200 кДа. FPLC-фракции после хроматографического разделения анализировали на наличие белков и нуклеиновых кислот (рис. 1а). При помощи anti-HC-Pro поликлональной кроличьей сыворотки были идентифицированы фракции с мол. м. 60 кДа, содержащие белок-супрессор HC-Pro, связанный с siRNA (рис. 1б). Из хроматографических фракций комплекс HC-Pro/siRNA был осажден с помощью Protein-G агарозы, после чего короткие РНК из комплекса HC-Pro/siRNA были изолированы с помощью тризола, фенол-хлороформа и метанола. В результате siRNA отделились от супрессорного белка HC-Pro без каких-либо структурных повреждений и потерь специфичности.

Спектральный анализ подтвердил наличие нуклеиновых кислот во фракциях 3–5, эквивалентных мол. м. комплекса HC-Pro/siRNA 60 кДа (рис. 1) [10, 16]. Концентрация РНК в очищенных препаратах определена в пределах 120–210 нг/мкл. Southern blot показал наличие коротких молекул РНК длиной 21–23 нуклеотида в хроматографических фракциях, содержащих вирусный супрессор HC-Pro (рис. 1б). После 3 независимых повторов FPLC, выделения и очистки комплекса HC-Pro/siRNA и изоляции sRNA комплекс HC-Pro/siRNA всегда обнаруживался во фракциях, соответствующих мол. м. 60 кДа. Весь пул изолированных siRNA после серии процедур по

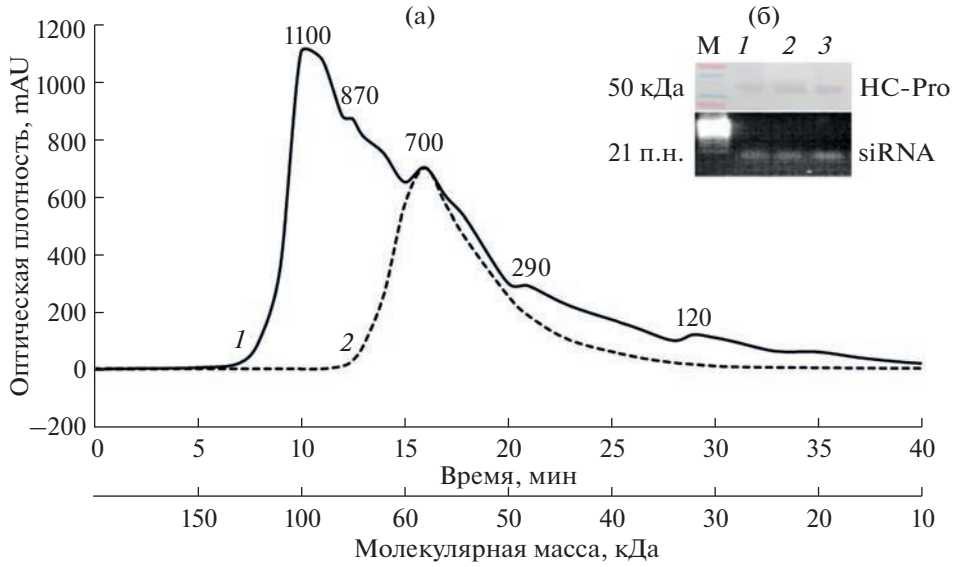


Рис. 1. Выделение и идентификация компонентов нуклеопротеинового комплекса HC-Pro/sRNA из PVY-инфицированных растений картофеля. **(а)** FPLC-хроматограмма профиля элюции белков, выделенных из образцов PVY-инфицированных растений. 1 – основной профиль элюции; 2 – элюция комплекса HC-Pro/siRNA (60 ± 5 кДа). **(б)** Western blot (сверху) с anti-HC-Pro поликлональной кроличьей сывороткой для идентификации комплекса HC-Pro/siRNA; Southern blot (снизу) для идентификации 21–23 п.н. sRNA. M – молекулярный маркер, цифрами отмечены номера FPLC-фракций. Примечание: было проведено 3 независимых повтора эксперимента. Комплекс HC-Pro/siRNA всегда обнаруживался во фракциях, эквивалентных мол. м. 60 кДа.

Таблица 1. Результаты ИФА и ПЦР диагностики сортов Изольда и Таврия на наличие вирусов картофеля

Сортообразец	Анализ образцов методом ИФА на наличие вирусов, ед. поглощения (AU, n=3)					Анализ образцов методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусов, порог цикла (Ct, n=3)					
	PLRV	PVM	PVS	PVX	PVY	PLRV		PVM	PVS	PVX	PVY
Изольда 2	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.688 ± 0.027	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 21.70 ± 0.1
Изольда 3	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.372 ± 0.031	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 19.62 ± 0.1
Изольда 5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.372 ± 0.037	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 19.67 ± 0.3
Таврия 2	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.042 ± 0.030	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 27.24 ± 0.1
Таврия 5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.663 ± 0.027	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 25.80 ± 0.2
Положительный контроль	1.195 ± 0.039	0.901 ± 0.025	0.889 ± 0.029	1.118 ± 0.034	1.047 ± 0.031	14.23 ± 0.1		17.10 ± 0.1	15.15 ± 0.1	16.20 ± 0.1	16.70 ± 0.1
Отрицательный контроль	0.067 ± 0.018	0.091 ± 0.021	0.068 ± 0.025	0.052 ± 0.020	0.089 ± 0.017	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a

Примечание: было проведено 3 независимых биологических повтора эксперимента. Значение представляет собой среднее ± стандартная ошибка среднего. N/a (no amplification) – нет амплификации, результат отрицательный. Pos – положительный, Neg – отрицательный. Были отобраны образцы, содержащие моноинфекцию PVY (Изольда 2, Изольда 3, Изольда 5, Таврия 2, Таврия 5).

Таблица 2. Идентификация CP-PVY siRNA в образцах листьев картофеля сортов Таврия и Изольда, инфицированных вирусом PVY

Сортообразец	Количество прочтений	21-п.н. РНК	miRNA	CP-PVY siRNA
Изольда 2	1 342 011	22	12	6
Изольда 3	856215	14	17	4
Изольда 5	1784321	7	10	7
Таврия 2	2410094	3	5	2
Таврия 5	1982016	18	11	2

Примечание: sRNA были изолированы из FPLC-фракций, содержащих HC-Pro/sRNA комплекс.

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности CP-PVY siRNA

Последовательность	Количество прочтений	Длина	Начало	Конец	Цепь
GATAAGGATGTGAATGCTGGT	4839	21 п.н.	101	121	Положительная
TAAGGATGTGAATGCTGGTAC	7901	21 п.н.	103	123	Положительная
GGCATTCTCATTTTGGACGTG	3428	21 п.н.	180	160	Отрицательная
GAGAAACTGAGATGCCAACTG	14762	21 п.н.	321	341	Положительная
TGCCAACTGTGATGAATGGGC	39016	21 п.н.	333	353	Положительная
GTTTAATTCGAAATCTGCGGG	6109	21 п.н.	564	564	Положительная
TCGAGGTTGGGCTGATTTCAA	27330	21 п.н.	683	703	Отрицательная

выделению и очистке комплекса HC-Pro/siRNA из растений, инфицированных PVY, был подвергнут глубокому секвенированию.

Высокопроизводительное секвенирование подтверждает наличие специфичных к белку оболочки вируса PVY коротких интерферирующих РНК в комплексе HC-Pro/siRNA

Последовательности нуклеотидов анализировали на наличие CP-PVY siRNA с помощью высокопроизводительного секвенирования. Секвенирование коротких РНК, изолированных из FPLC-фракций, содержащих комплекс HC-Pro/siRNA, после хроматографии образцов листьев картофеля сортов Таврия и Изольда показало от 1342011 до 2410094 прочтений. Для детального анализа были выбраны 50 лучших прочтений длиной от 19 до 24 оснований и от 3428 до 251090 прочтений для одной последовательности. Полученные последовательности были отсортированы в алфавитном порядке и проанализированы с помощью BLASTN на идентичность последовательности CP-PVY.

После удаления коротких (менее 20 оснований), более длинных sRNA (более 23 оснований) и больших наборов перекрывающихся последовательностей из 50 наиболее распространенных последовательностей оставшиеся уникальные и простые наборы перекрывающихся последовательностей были идентифицированы в базе данных miRNA (табл. 2).

CP-PVY siRNA были обнаружены в 50 наиболее распространенных последовательностях sRNA, в диапазоне от 2 до 7 уникальных последовательностей. Результаты секвенирования коротких РНК, полученных из хроматографических фракций PVY-инфицированных экспериментальных сортов Таврия и Изольда, представлены в табл. 3. Идентифицированные CP-PVY siRNA были комплементарны к различным участкам генома вируса как к положительной, так и к отрицательной цепям, в разных точках начала и конца трансляции. Таким образом, нам удалось выделить нуклеопротеиновый комплекс HC-Pro/siRNA из зараженных вирусом картофеля Y растений и идентифицировать специфичные к белку оболочки вируса PVY короткие интерферирующие РНК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние коротких интерферирующих РНК на защитные противовирусные механизмы РНК-интерференции в данный момент активно изучается во всем мире. Наиболее эффективно антивирус-

ную защиту активируют siRNA специфичные к белку оболочки PVY [17]. Остаются не ясными многие аспекты молекулярного взаимодействия инструментов противовирусной защиты РНК-интерференции, важное значение в которой имеют короткие РНК. При попадании вирусной РНК в растительную клетку продуцируются dsRNA, которые посредством фермента DICER запускают внутриклеточный механизм, генерирующий короткие РНК. Короткие интерферирующие РНК активируют резистентность к вирусам путем программирования эффекторного комплекса RISC. Однако, в связи с постоянным появлением новых вредоносных рекомбинантных штаммов PVY вопрос изучения профилей sRNA для инициации устойчивости к вирусам приобретает особую актуальность. Более того, PVY использует клеточные механизмы для синтеза супрессорного белка HC-Pro, который блокирует защитную РНК-интерференцию путем захвата и удержания коротких РНК на поверхности субъединиц белка [11, 12, 18]. Мы обнаружили, что это свойство HC-Pro можно использовать для изоляции и очистки PVY-специфичных siRNA с целью последующего изучения их влияния на антивирусную защиту растений. Из PVY-инфицированных растений картофеля сортов Таврия и Изольда с помощью FPLC был фракционирован комплекс HC-Pro/siRNA (60 кДа) и осажден из фракций с использованием Protein G-agarose. Мол. вес выхода фракций, содержащих нуклеопротеиновый комплекс HC-Pro/siRNA, соответствует суммарному значению мол. м. HC-Pro, равной 50 кДа, и массе связанного с ним дуплекса 21–23 п.н. siRNA [11, 16]. После 3 независимых повторов FPLC, выделения и очистки комплекса HC-Pro/siRNA и изоляции sRNA комплекс HC-Pro/siRNA всегда обнаруживался во фракциях, соответствующих мол. м. 60 кДа. С помощью глубокого секвенирования коротких РНК в составе комплекса HC-Pro/siRNA были идентифицированы siRNA, специфичные к coat protein PVY, поскольку именно этот тип коротких интерферирующих РНК способен модулировать стабильную устойчивость к PVY у растений картофеля [17, 18]. Супрессорный белок HC-Pro с высокой специфичностью способен связывать множество фрагментов siRNA (примерно 30% из 50 наиболее распространенных sRNA). Профиль siRNA листовых экстрактов показал присутствие в комплексе HC-Pro/siRNA комплиментарных различным участкам CP-PVY как из положительной, так и отрицательной цепей. Количество прочтений последовательности для CP-PVY siRNA в листовых пробах составлял от 3428 до 251 090, что свидетельствует о небольшом количестве CP-PVY siRNA, связанных HC-Pro, относительно всего пула коротких РНК в комплексе HC-Pro/sRNA. Это объясняется тем, что вовлечение в нуклеопротеиновый комплекс происходит на основании размера молекулы РНК длиной 20–23 п.н. Тем не менее, идентифицированные CP-PVY siRNA потенциально смогут с высокой эффективностью активировать антивирусную резистентность к PVY у растений картофеля путем препятствования репликации вирусной РНК.

Методологический подход изоляции коротких РНК из тканей PVY-инфицированных растений *S. tuberosum* с помощью FPLC-фракционирования комплекса супрессорного протеина HC-Pro с молекулами коротких РНК с последующим секвенированием sRNA позволяет в значительной степени пополнить существующую базу данных нуклеотидных последовательностей коротких РНК, которые можно использовать в качестве объекта изучения регуляторных сигналов устойчивости к новым рекомбинантным штаммам PVY. Это исследование будет полезным для изучения и анализа PVY-специфичных siRNA, а также стимулировать новые исследования в области защиты растений от вирусных инфекций.

Исследования были проведены в рамках научного проекта “Разработка и внедрение инновационной технологии, направленной на придание антивирусной резистентности сортам сельскохозяйственных культур”, финансируемого Министерством науки и высшего образования Республики Казахстан, Индивидуальный регистрационный номер (ИРН): AP08052163.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсоры не участвовали в разработке исследования; при сборе, анализе или интерпретации данных; в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Loebenstein G., Manadilova A.* Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries // Springer, Dordrecht, Netherlands. 2003. P. 195. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0791-7_8
2. *Chikh-Ali M., Tran L.T., Price W.J., Karasev A.V.* Effects of the age-related resistance to potato virus Y in potato on the systemic spread of the virus, incidence of the potato tuber necrotic ringspot disease, tuber yield, and translocation rates into progeny tubers // Plant Disease. 2020. V. 104. P. 269. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1201-RE
3. *Ghildiyal M., Zamore P.D.* Small silencing RNAs: an expanding universe // Nat. Rev. Genet. 2009. V. 10. P. 94. https://doi.org/10.1038/nrg2504
4. *Bushra T., Idrees A.N., Usman A., Tayyab H.* How RNA interference combat viruses in plants // Functional Genomics. 2012. V. 6. P. 113. https://doi.org/10.5772/51870
5. *Carthew R.W., Sontheimer E.J.* Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs // Cell. 2009. V. 136. P. 642. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035

6. *Dunoyer P., Himber C., Voinnet O.* DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal // Nat. Genet. 2005. V. 37. P. 1356. https://doi.org/10.1038/ng1675
7. *Omarov R., Sparks K., Smith L., Zindovic J., Scholthof H.B.* Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs // J. Virol. 2006. V. 80. P. 3000. https://doi.org/10.1128/JVI.80.6.3000-3008.2006
8. *Li F., Ding S.* Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity // Annu. Rev. Microbiol. 2006. V. 60. P. 503. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142205
9. *Sutula M.Y., Akbassova A.Z., Yergaliev T.M., Nurbekova Zh.A., Mukiyanova G.S., Omarov R.T.* Endowing plants with tolerance to virus infection by their preliminary treatment with short interfering RNAs // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 939. https://doi.org/10.1134/S1021443717060103
10. *Valli A.A., Gallo A., Rodamilans B., Lopez-Moya J.J., García J.A.* The HCPro from the Potyviridae family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have // Molecular plant pathology. 2018. V. 19. P. 744. https://doi.org/10.1111/mpp.12553
11. *Shiboleth Y.M., Haronsky E., Leibman D., Arazi T., Wassenegger M., Whitham S.A., Gaba V., Gal-On A.* The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development // J. Virol. 2007. V. 81. P. 13135. https://doi.org/10.1128/JVI.01031-07
12. *Rawlings R.A., Krishnan V., Walter N.G.* Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete Dicer and RISC via multiple turnover // J. Mol. Biol. 2011. V. 408. P. 262. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.038
13. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. 1962. V. 15. P. 473. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
14. *Coskun O.* Separation techniques: Chromatography // North Clin Istanb. 2016. V. 3. P. 156. https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757
15. *Toni L.S., Garcia A.M., Jeffrey D.A., Jiang X., Stauffer B.L., Miyamoto Sh.D., Sucharov C.C.* Optimization of phenol-chloroform RNA extraction // MethodsX. 2018. V. 5. P. 599. https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011
16. *Plisson C., Drucker M., Blanc S., German-Retana S., Le Gall O., Thomas D., Bron P.* Structural characterisation of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 23753. https://doi.org/10.1074/jbc
17. *McCue K.F., Ponciano G., Rockhold D.R., Whitworth J.L., Gray S.M., Fofanov Yu., Belknap W.R.* Generation of PVY Coat Protein siRNAs in Transgenic Potatoes Resistant to PVY // American J. Potato Res. 2012. V. 89. https://doi.org/10.1007/s12230-012-9257-0
18. *Del Toro F.J., Donaire L., Aguilar E., Chung B.N., Tenllado F., Canto T.* Potato virus Y HCPro suppression of antiviral silencing in *Nicotiana benthamiana* plants correlates with its ability to bind *in vivo* to 21- and 22-nucleotide small RNAs of viral sequence. J. Virol. 2017. V. 91. https://doi.org/10.1128/JVI.00367-17

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 372–381

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

Памяти Игоря Михайловича Андреева посвящается

Ca^{2+}-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ СЕМЯДОЛЕЙ ЛЮПИНА

© 2023 г. А. Г. Шугаев[a], *, П. А. Буцанец[a], Н. А. Шугаева[a]

[a] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.
После доработки 12.01.2023 г.
Принята к публикации 12.01.2023 г.

Изучено влияние экзогенного Ca^{2+} на дыхание, генерацию мембранного потенциала, изменение объема и проницаемость для протонов внутренней мембраны митохондрий, выделенных из семядолей этиолированных проростков люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.). Используемые в работе митохондрии характеризовались прочным сопряжением процессов окисления и фосфорилирования. Высокая функциональная активность митохондрий подтверждалась их способностью генерировать при окислении сукцината трансмембранный градиент протонов на внутренней мембране (мембранный потенциал или $\Delta\Psi$), а также устойчиво поддерживать его в течение длительного времени, как за счет работы электрон-транспортной цепи, так и за счет гидролиза АТФ в условиях анаэробиоза. Показано, что присутствие 60–120 мкМ $CaCl_2$ в среде инкубации митохондрий не оказывало существенного влияния на скорость окисления сукцината и параметры окислительного фосфорилирования, однако индуцировало диссипацию $\Delta\Psi$ в условиях исчерпания кислорода в среде инкубации. Максимально полное удаление Ca^{2+} из среды в присутствии хелаторов (ЭГТА, ЭДТА) предотвращало сброс мембранного потенциала. Ca^{2+}-зависимая деполяризация внутренней мембраны ингибировалась дитиотрейтолом, что предполагает участие в этом процессе активных форм кислорода. Сброс мембранного потенциала не сопровождался набуханием митохондрий и не был чувствителен к циклоспорину А. С использованием металлохромного Ca^{2+}-индикатора арсеназо III, было показано, что митохондрии семядолей люпина способны активно поглощать экзогенный Ca^{2+} и накапливать его в матриксе. Ca^{2+}-индуцируемая диссипация $\Delta\Psi$ в условиях анаэробиоза сопровождалась выходом Ca^{2+} из митохондрий, скорость которого резко возрастала в присутствии кальциевого ионофора А23 (А23187). Предполагается, что накопление Ca^{2+} и повышение уровня активных форм кислорода в матриксе, индуцирует в условиях анаэробиоза обратимую пермеабилизацию внутренней мембраны митохондрий семядолей люпина, которая обусловлена открытием поры неспецифической проницаемости в состоянии низкой проводимости, проницаемой для протонов и, возможно, для других небольших катионов (Na^+, K^+, Ca^{2+}).

Ключевые слова: *Lupinus angustifolius*, митохондрии, мембранный потенциал, окисление сукцината, проницаемость внутренней мембраны, семядоли люпина, транспорт кальция

DOI: 10.31857/S0015330322600814, **EDN:** PZENWD

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизма регулируемого изменения (увеличения) проницаемости внутренней мембраны митохондрий животных, растений и дрожжей для протонов и других небольших молекул, благодаря открытию в ней специального канала или поры, получившей название PTP (от Permeability Transition Pore) позволило выявить еще одну важнейшую функцию этих органелл. Было установлено, что наряду с процессом окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ, необходимого для обеспечения жизнедеятельности любой клетки, индукция PTP, под влиянием различных неблагоприятных и патологических факторов инициирует, по крайней мере, в митохондриях млекопитающих, процесс программируемой клеточной

Сокращения: А23 (А23187) – кальциевый ионофор; МРК – митохондриальный разобщающий канал; ПГК – программируемая гибель клеток; СДГ – сукцинатдегидрогеназа; СК – салициловая кислота; ETH129 – кальциевый ионофор; MCU (mitochondrial calcium uniporter) – митохондриальный Ca^{2+} – унипортер; PTP (Permeability Transition Pore) – пора неспецифической проницаемости во внутренней мембране митохондрий; $\Delta\Psi$ (дельтапси) – мембранный потенциал.

гибели (ПГК) по пути апоптоза, благодаря выходу из органелл различных проапоптозных белков [1–3]. Хотя в отношении структуры PTP продолжаются дискуссии, установлено, что этот канал может функционировать в митохондриях в двух состояниях или подсостояниях. Гораздо лучше изучена работа PTP в состоянии высокой проводимости, когда через этот мегаканал через внутреннюю мембрану митохондрий могут проникать достаточно крупные молекулы с массой до 1.5 кДа, например, сахароза. Функционирование PTP в этом состоянии, кроме диссипации $\Delta\Psi$ приводит к высокоамплитудному набуханию митохондрий, нарушению целостности их внешней мембраны и выходу из органелл цитохрома *c* и ряда других белков, запускающих процессы программируемой клеточной гибели (ПГК) по пути апоптоза (или некроза) [2]. Учитывая особую важность для клетки данного физиологического процесса, регуляция функционирования PTP чрезвычайно сложна, она включает десятки эффекторов и остается не до конца изученной, даже в митохондриях животных. Возможно, это связано с недостаточной изученностью молекулярной природы этого канала. Вместе с тем, среди исследователей существует консенсус относительно того, что основными индукторами PTP, наряду с активными формами кислорода (АФК), являются ионы Ca^{2+}, и основная масса публикаций по данной проблеме посвящена изучению влияния именно этих эффекторов на функционирование PTP в митохондриях животных, дрожжей и растений [1, 3–8]. В состоянии низкой проводимости PTP проницаема для протонов и низкомолекулярных катионов (K^+, Na^+, и, по-видимому, Ca^{2+}). В этом состоянии функционирование PTP легко обратимо, не сопровождается набуханием органелл, но приводит к диссипации мембранного потенциала ($\Delta\Psi$). Постулируется, что в данном состоянии PTP может вовлекаться в передачу Ca^{2+}-сигнала и/или в регуляцию концентрации этого иона в матриксе за счет его быстрого выхода из органелл [2–4].

Доказательства присутствия PTP в митохондриях растений были получены 20 лет назад [8–10], однако, публикации, посвященные изучению этого канала остаются немногочисленными, а полученные результаты достаточно противоречивыми. Трудности в изучении PTP возникают, в частности, вследствие того, что органеллы, выделенные из митохондрий ряда растительных объектов (клубней картофеля, листьев кабачка), оказались не способны активно поглощать из среды инкубации и накапливать в матриксе ионы Ca^{2+}, по-видимому, вследствие отсутствия или низкой активности Ca^{2+}-унипортера (MCU) [8, 11, 12]. Поэтому, для создания условий накопления Ca^{2+} в матриксе и индукции PTP в таких митохондриях исследователи вынуждены использовать или очень высокие, нефизиологические концентрации этого катиона в среде инкубации [8–10] или Ca^{2+}-ионофы [12]. Кроме того, было обнаружено, что некоторые механизмы, регулирующие функционирование PTP в митохондриях животных, не работают у растений. Так, например, открытие PTP в митохондриях растений, может быть нечувствительно к ингибированию циклоспорином А (ЦсА), что является диагностическим тестом для выявления функционирования данного канала в митохондриях животных [8, 10]. Наконец, было обнаружено, что многие последствия индукции PTP в митохондриях растений (набухание органелл, выход цитохрома *c*, ингибирование в присутствии аденилатов), могут быть имитированы открытием во внутренней мембране другого канала – АТФ-чувствительного K^+-канала ($Рмито K_{АТФ}$) [13]. Эти результаты свидетельствуют, что функционирование PTP в митохондриях растений имеет ряд особенностей, в частности, открытие этого канала может быть не чувствительно к ЦсА, и не всегда приводит к набуханию органелл [7, 8, 12].

Ранее нами было показано, что присутствие в среде инкубации митохондрий семядолей люпина стрессового фитогормона, салициловой кислоты (СК), которое активировало образование АФК, вызывало, резкое увеличение протонной проницаемости внутренней мембраны органелл и диссипацию $\Delta\Psi$, которые предотвращались присутствием антиоксидантов и полностью обращались внесением в среду инкубации митохондрий восстановителей, например, дитиотрейтолом (ДТТ) [14, 15]. Полученные результаты позволили предположить, что СК способна индуцировать пермеабилизацию внутренней мембраны митохондрий растений в результате открытия АФК-зависимого, проницаемого для протонов разобщающего канала (МРК), который, по-видимому, является особым состоянием (подсостоянием) PTP функционирующей в состоянии низкой проводимости [14]. В данной работе для выяснения механизмов регуляции МРК в митохондриях семядолей люпина нами было изучено влияние на его индукцию ионов Ca^{2+}, который, как уже отмечалось, наряду с АФК, является ключевым регулятором работы PTP в митохондриях животных, растений и дрожжей.

Таким образом, целью данной работы являлось изучение влияния экзогенного кальция на дыхание и проницаемость внутренней мембраны митохондрий семядолей люпина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили митохондрии, выделенные из семядолей этиолированных проростков люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L., сорт “Ладный”). Проростки люпина выра-

щивали в течение 5 дней на дистиллированной воде в термостате при 24–25°С в темноте.

Выделение митохондрий из семядолей проростков люпина осуществляли, используя единую методику дифференциального центрифугирования, описанную ранее [16] в небольшой модификации. Семядоли массой 12 г промывали дистиллированной водой, высушивали, охлаждали в холодной комнате, измельчали в ступке со средой гомогенизации (в соотношении 1 : 4), содержащей: 0.5 М сахарозу, 50 мМ HEPES-буфер (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА, 5 мМ ДТТ и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Гомогенат отфильтровывали через 4 слоя мираклоса и центрифугировали при 4000 *g* в течение 5 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 15000 *g* в течение 5 мин. Осадок митохондрий ресуспендировали и отмывали в среде, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.4), 5 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ЭГТА, 0.1% БСА, затем центрифугировали при 4000 *g* в течение 5 мин. Полученный супернатант, содержащий митохондрии центрифугировали при 13000 *g* в течение 10 мин. Осадок митохондрий ресуспендировали в малом объеме среды, содержащей: 0.3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.2) и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Пробирку с суспензией митохондрий (10–15 мг/мл) хранили на льду. Все операции проводили в холодной комнате при 2–4°С.

Поглощение кислорода митохондриями измеряли полярографическим (или амперометрическим) методом с использованием кислородного электрода типа Кларка. Стандартная инкубационная среда (1 мл) содержала: 0.3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.4), 1 мМ $MgCl_2$, 2 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4) и 0.1% БСА, свободный от ЖК и 0.6–0.8 мг белка митохондрий. В качестве субстрата окисления использовали 5 мМ сукцинат в присутствии 100 мкМ АТФ необходимого для предотвращения ингибирования СДГ оксалоацетатом и поддержания мембранного потенциала в условиях анаэробиоза за счет работы АТФазы. Остальные добавки и условия экспериментов приведены в подписях к рисункам. Скорость поглощения кислорода при окислении дыхательного субстрата митохондриями в различных метаболических состояниях, величину коэффициента дыхательного контроля (ДК) и отношения АДФ/О рассчитывали по методу Chance и Williams [17]. Количество митохондриального белка определяли по методу Бредфорд [18], используя БСА в качестве стандарта.

За генерацией мембранного потенциала ($\Delta\Psi$) на внутренней мембране митохондрий следили по изменению разности поглощений при 511 и 533 нм сафранина О [19] на спектрофотометре Hitachi-557 в двухволновом режиме работы. Стандартная среда инкубации (2 мл) при комнатной температуре дополнительно содержала 5 мкМ сафранин и около 0.5 мг/мл митохондриального белка. Остальные добавки приведены в подписях к рисункам.

Изменение уровня ионов Ca^{2+} в среде инкубации митохондрий регистрировали по разности поглощений металлохромного индикатора арсеназо III при двух длинах волн (665 и 685 нм) на спектрофотометре Hitachi-557 [20]. Среда инкубации содержала 0.3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.4), 2 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 25 мкМ арсеназо III, 5 мМ сукцинат, 200 мкМ АДФ, 0.1% БСА свободный от ЖК, а также 20 или 100 мкМ $CaCl_2$. Остальные добавки приведены в подписях к рисункам.

Изменение объема митохондрий. Набухание и сжатие митохондрий (0.25–0.35 мг белка/мл) регистрировали по изменению поглощения (мутности) суспензии при 540 нм в двухлучевом режиме с помощью спектрофотометра Hitachi-557. Среды опытной кюветы и кюветы сравнения (2 мл) содержали: 0.3 М сахарозу и 10 мМ HEPES-буфер (pH 7.4). Дополнительный состав сред опытной кюветы приведен в подписях к рисунку. Добавки, там, где это указано на рисунке, вносили в минимальных объемах, при необходимости проводилась соответствующая коррекция оптической плотности сред вследствие разведения.

В работе использованы следующие реактивы: $CaCl_2$, $MgCl_2$, KH_2PO_4 и другие соли были отечественного производства марки о.с.ч. или х.ч. Дыхательные субстраты, нуклеотиды, БСА свободный от ЖК, MOPS, HEPES, ЭГТА, FCCP, NADH, сафранин О, А23, аламецитин и др. – фирмы “Sigma”(США), арсеназо III – фирмы “Serva” (Германия).

Все опыты и серии опытов были выполнены в трех биологических и трех аналитических повторностях. На рисунках представлены данные характерных опытов, в таблицах и графиках представлены средние значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние Ca^{2+} на окисление сукцината митохондриями семядолей люпина

В таблице 1 приведены результаты полярографических опытов по изучению влияния различных концентраций экзогенного Ca^{2+} на окисление сукцината митохондриями семядолей проростков люпина. Судя по представленным данным, используемые в работе митохондрии имели высокую функциональную интактность. В частности, окисление митохондриями дыхательных субстратов, например, сукцината, осуществлялось с высокой скоростью, оно существенно стимулировалось добавками АДФ (состояние 3), а затем тормозилось после его исчерпания в процессе синтеза АТФ (состояние 4). При этом величина дыхатель-

Таблица 1. Влияние $CaCl_2$ на дыхание и параметры окислительного фосфорилирования при окислении сукцината митохондриями семядолей люпина

Вариант	Состояние 3	Состояние 4	ДК	АДФ/О
Контроль	186 ± 20	69 ± 14	2.7 ± 0.5	1.6 ± 0.1
50 мкМ $CaCl_2$	190 ± 25	67 ± 15	2.8 ± 0.5	1.6 ± 0.2
100 мкМ $CaCl_2$	196 ± 21	73 ± 20	2.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2
300 мкМ $CaCl_2$	209 ± 27	82 ± 26	2.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3

Примечание. Состав стандартной среды инкубации см. в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Дополнительно вносили 5 мМ сукцинат, 100 мкМ АТФ, а также 100 мкМ АДФ при окислении сукцината в состоянии 3. Скорости окисления субстрата выражены в нг-атом O_2/(мин/мг белка митохондрий).

ного контроля (ДК) по Чансу (состояние 3/состояние 4) составляла около 3, что свидетельствовало о прочном сопряжении процесса окислительного фосфорилирования, а близкая к теоретической величина отношения АДФ/О (равная 1.6–1.5) указывала на его высокую эффективность. Ранее нами было показано, что выделенные аналогичным способом митохондрии люпина столь же эффективно окисляли малат и другие НАД-зависимые дыхательные субстраты [16]. Далее было установлено, что присутствие в среде инкубации митохондрий ионов Ca^{2+} даже в сравнительно высокой концентрации (50–100 мкМ) не оказывало существенного влияния, ни на скорости окисления сукцината в различных метаболических состояниях, ни на величину коэффициента ДК и отношения АДФ/О (табл. 1). Незначительное разобщение дыхания, которое выражалось в увеличении скорости окисления сукцината в состоянии 4, а также в снижении величины ДК и АДФ/О, проявлялось только при использовании достаточно высоких (300 мкМ и выше) концентраций Ca^2 (табл. 1).

Транспорт Ca^{2+} в митохондриях семядолей люпина

С учетом, отмеченных во введении, противоречивых литературных данных относительно особенностей функционирования Ca^{2+}-транспортирующих механизмов в митохондриях растений, а также отмеченного выше слабого действия Ca^{2+} на дыхание митохондрий люпина, представляло интерес выяснение возможности этих органелл к поглощению и накоплению в матриксе экзогенного Ca^{2+}. С этой целью для регистрации изменения уровня Ca^{2+} в среде инкубации митохондрий нами был использован металлохромный индикатор арсеназо III. Было обнаружено, что митохондрии семядолей в присутствии дыхательного субстрата (сукцината) и кислорода способны поглощать экзогенный Ca^{2+} в диапазоне концентраций 20–200 мкМ с достаточно высокой для растительных митохондрий скоростью, примерно, 15 нмоль Ca^{2+}/(мин/мг белка) (рис. 1а). Необходимо отметить, что процесс поглощения Ca^{2+} в митохондрии зависел от присутствия в среде инкубации неорганического фосфата (P_i) и был активным, поскольку тормозился, как в отсутствие P_i, так и в присутствии разобщителей дыхания, например, FCCP (рис. 1а, кривые *1, 2*). Кроме того, переносчик, катализирующий транспорт Ca^{2+} в матрикс, характеризовался достаточно низким сродством к кальцию, поскольку при внесении в среду инкубации 20 мкМ Ca^{2+} скорость его поглощения митохондриями быстро снижалась, но восстанавливалась после следующей добавки 20 мкМ Ca^{2+} (рис. 1а, кривая 3). Если добавка FCCP в среду инкубации происходила после нескольких минут поглощения Ca^{2+}, тогда торможение транспорта кальция в матрикс выявляло существование противоположного процесса, а именно, выхода поглощенного Ca^{2+} из митохондрий (рис. 1а, кривая 3).

На рис. 1б показана динамика транспорта 100 мкМ Ca^{2+} через внутреннюю мембрану митохондрий люпина. Видно, что в течение 10–12 мин наблюдалась практически линейная скорость поглощения Ca^{2+} митохондриями, после чего направленность процесса резко менялась и регистрировался выход накопленного кальция из матрикса. Как было показано в полярографических исследованиях с использованием кислородного электрода, за указанный временной период (10–12 мин) поглощения митохондриями Ca^{2+} происходило исчерпание кислорода в среде инкубации при окислении сукцината. Обращение транспорта Ca^{2+} при наступлении условий анаэробиоза подтверждалось и тем фактом, что внесение в среду инкубации небольшого количества кислорода, например, в результате ее барбатирования воздухом, и последующее его исчерпание при окислении субстрата, было способно неоднократно изменять направленность транспорта Ca^{2+} в митохондриях люпина. Наконец, быстрое удаление всего накопленного митохондриями Ca^{2+} происходило после добавки ионофора А23 (рис. 1б). Добавка хелатора кальция – ЭГТА (500 мкМ) снижала содержание Ca^{2+} в среде инкубации митохондрий до исходного уровня. Таким образом, интактные митохондрии семядолей люпина способны катализировать

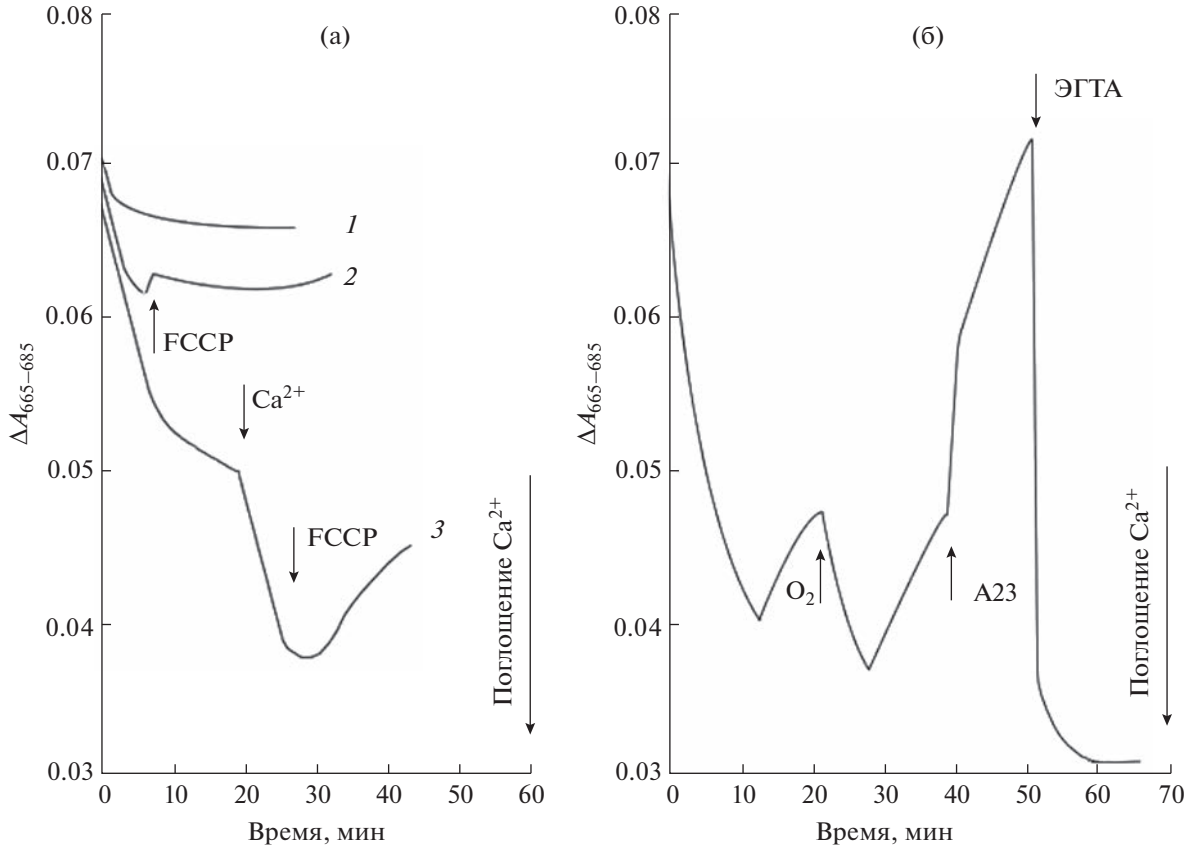


Рис. 1. Транспорт экзогенного Ca^{2+} в митохондриях семядолей люпина. Условия измерения – в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Стандартная реакционная среда в присутствии 0.3–0.4 мг/мл митохондриального белка, а также 20 мкМ Ca^{2+} (рис. 1а) или 100 мкМ Ca^{2+} (рис. 1б), дополнительно вносили, где указано: 20 мкМ Ca^{2+}, 5 мкМ A23, 0.5 мкМ FCCP, 1 мМ ЭГТА. $\uparrow O_2$ – барбатирование инкубационной среды воздухом. *1, 2* – транспорт Ca^{2+} в митохондриях в отсутствие неорганического фосфата или в присутствии FCCP соответственно; *3* – кинетика поглощения 20 мкМ Ca^{2+} митохондриями люпина.

процессы активного поглощения (импорта) экзогенного Ca^{2+}, а также его выхода (экспорта) во внешнюю среду, который проявлялся в условиях ингибирования транспорта этого катиона в матрикс.

Влияние Ca^{2+} на генерацию мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий люпина

Генерацию мембранного потенциала ($\Delta\Psi$), который является наиболее чувствительным индикатором процессов разобщения и сопряжения в ЭТЦ, изучали в тех же экспериментальных условиях, что и дыхание митохондрий. Как и следовало ожидать, высокая функциональная активность, используемых в данной работе митохондрий, подтверждалась их способностью к быстрой генерации $\Delta\Psi$ при окислении сукцината в присутствии АТФ и его поддержанию в течение продолжительного времени даже после исчерпания кислорода в среде инкубации (рис. 2, кривая 1). Поскольку скорость дыхания митохондрий люпина при окислении сукцината была достаточно высокой, условия анаэробиоза в среде инкубации органелл возникали по истечении короткого интервала времени (10–12 мин), длительность которого определялась в полярографических опытах с использованием кислородного электрода (данные не приведены). Этот интервал времени также соответствовал результатам опытов по изучению динамики транспорта Ca^{2+} (рис. 1б). В отсутствие кислорода потенциал на внутренней мембране митохондрий люпина поддерживался благодаря гидролизу АТФ, что подтверждалось его диссипацией под влиянием олигомицина (рис. 2, кривая *1*). Таким образом, полученные результаты показали, что митохондрии люпина способны генерировать и в течение длительного времени поддерживать $\Delta\Psi$, как в условиях аэробиоза при окислении сукцината, так и в условиях анаэробиоза, за счет гидролиза АТФ. Эти данные также подтверждают целостность внутренней мембраны органелл и ее низкую проницаемость для протонов.

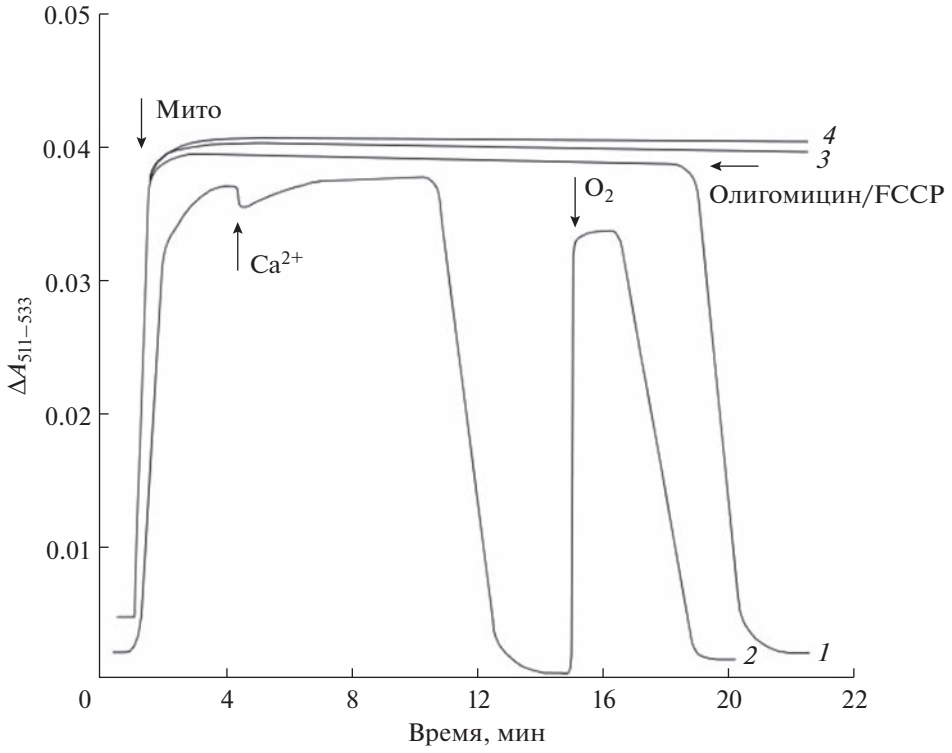


Рис. 2. Влияние ионов Ca^{2+} на генерацию мембранного потенциала ($\Delta\Psi$) в митохондриях семядолей люпина. Условия измерения – в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Стандартная среда инкубации содержала 5 мкМ сафранин и около 0.5 мг/мл митохондриального белка. Дополнительно вносили 100 мкМ Ca^{2+}, 20 мкМ олигомицин, 0.5 мкМ FCCP, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ. $\uparrow O_2$ – барбатирование инкубационной среды воздухом. *1* – контроль, генерация и длительное поддержание $\Delta\Psi$ на внутренней мембране при окислении сукцината и гидролизе АТФ; *2* – диссипация $\Delta\Psi$ под влиянием 100 мкМ Ca^{2+} в условиях анаэробиоза (через 10–12 мин окисления субстрата), *3, 4* – ингибирование Ca^{2+}-индуцируемой (в присутствии 100 мкМ Ca^{2+}) деполяризации внутренней мембраны митохондрий под влиянием ЭГТА или ДТТ соответственно.

Далее нами было изучено влияние Ca^{2+} на генерацию $\Delta\Psi$ и возможность индукции МРК (или PTP) в митохондриях люпина. Следует отметить, что в выборе действующих концентраций Ca^{2+} мы опирались на литературные данные, согласно которым для индукции PTP в митохондриях растений и дрожжей требуются достаточно высокие (вплоть до миллимолярных) концентрации этого катиона [8, 9, 12, 21–24]. Причиной этого, возможно, является низкая активность и/или низкое сродство основного переносчика (по-видимому, унипортера), катализирующего транспорт Ca^{2+} в матрикс митохондрий ряда растений и дрожжей [8, 23, 24]. На рис. 2, кривая *2* показано действие ионов Ca^{2+} на величину $\Delta\Psi$ в митохондриях люпина. Видно, что добавка 200 мкМ $CaCl_2$ в среду инкубации органелл или совсем не влияла, или незначительно снижала величину потенциала. Судя по этим данным, ионы Ca^{2+} не оказывают существенного разобщающего действия на окисление сукцината, что согласуется с результатами полярографических опытов (табл. 1). Тем не менее, присутствие ионов Ca^{2+} индуцировало, после лаг-периода (10–12 мин), быструю диссипацию $\Delta\Psi$ (рис. 2, кривая *2*). Деполяризация мембраны была полностью обратима после аэрации среды, однако, после исчерпания кислорода в ходе дыхания митохондрий, вновь наблюдался сброс потенциала (рис. 2, кривая *2*). Деполяризацию мембраны под влиянием Ca^{2+} можно было предотвратить внесением в среду инкубации ЭГТА, а, кроме того, удалением из нее P_i, необходимого, как было показано выше, для транспорта этого катиона в матрикс (рис. 2, кривые *3* и *4*). Интересно, что ЭГТА ингибировала диссипацию $\Delta\Psi$, если была добавлена в реакционную среду предварительно или через 1–2 мин после добавки Ca^{2+}, более позднее внесение хелатора не предотвращало и не обращало диссипацию $\Delta\Psi$. Следует отметить, что Ca^{2+}-зависимая деполяризация внутренней мембраны митохондрий люпина не ингибировалась ЦсА (данные не приведены), но полностью предотвращалась в присутствии мощного восстановителя – ДТТ, что предполагает участие в этом процессе АФК (рис. 2, кривая *5*).

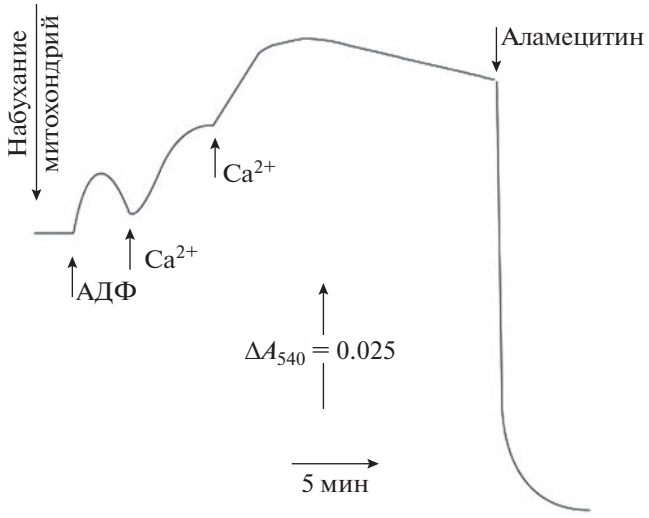


Рис. 3. Влияние Ca^{2+} на изменение объема митохондрий семядолей люпина. Условия опытов и составы сред – в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Там, где указано на рисунке в опытную кювету дополнительно вносили: 100 мкМ АДФ, 100 мкМ Ca^{2+}, 15 мкг/мл аламецитин.

Влияние транспорта Ca^{2+} на изменение объема митохондрий семядолей люпина

Судя по литературным данным, индукция PTP в митохондриях животных, как правило, сопровождалась не только диссипацией $\Delta\Psi$, но и высокоамплитудным набуханием органелл, ведущего к нарушению целостности внешней мембраны и выходу из межмембранного пространства цитохрома *c* и других проапоптозных белков [1–3]. Что касается митохондрий растений, то здесь ситуация неоднозначная. В ряде работ была обнаружена взаимосвязь между индукцией PTP и набуханием митохондрий [8–10], однако, в других исследованиях этого не наблюдалось [12, 22]. В используемых нами условиях, внесение Ca^{2+} в среду инкубации дышащих митохондрий люпина, даже при использовании довольно высоких его концентраций (до 200 мкМ), сопровождалось не набуханием, а сжатием органелл (рис. 3). В этих условиях набухание митохондрий регистрировалось только после добавки аламецитина, способного образовывать во внутренней мембране митохондрий пору, диаметр которой примерно равен диаметру PTP в состоянии высокой проводимости, проницаемой для молекул с мол. массой до 1.5 кДа, в том числе, для молекул сахарозы (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что митохондрии семядолей люпина обладали способностью к поглощению Ca^{2+} из внешней среды и накоплению его в матриксе. Также было установлено, что этот процесс является энергозависимым и характеризуется абсолютной необходимостью присутствия P_i в среде инкубации. Кроме того, было показано, что поглощение Ca^{2+} митохондриями семядолей люпина осуществлялось с относительно низкой скоростью, около 15 нмоль Ca^{2+}/(мин/мг белка), которая на порядок ниже аналогичной скорости импорта этого катиона в митохондрии животных, катализируемого Ca^{2+}-унипортером [24]. При этом, она соответствовала низкой интенсивности поглощения Ca^{2+} митохондриями, выделенными из ряда других растительных объектов [10, 11, 25]. В этой связи высказывается сомнение в том, что митохондрии могут участвовать в регуляции уровня Ca^{2+} в цитозоле клеток растений [25]. Полученные результаты также подтвердили, имеющиеся в литературе, данные о низкой затрате энергии, требуемой для активного транспорта Ca^{2+} в митохондриях растений, что выражалось в слабом разобщении дыхания, т.е. в незначительном увеличении скорости окисления субстрата в состоянии 4 и снижении величины $\Delta\Psi$ [24]. Очевидно, это обусловлено особенностями механизмов транспорта Ca^{2+} в митохондриях растений, функционирование которых остается малоизученным несмотря на почти полувековую историю проведения подобных исследований.

Результаты, полученные в данной работе, позволили получить новую важную информацию о роли ионов Ca^{2+} в индукции проницаемости внутренней мембраны в митохондриях люпина, вследствие открытия в ней разобщающего канала, проницаемого для протонов (МРК). Судя по ряду показателей, индукция МРК под влиянием Ca^{2+} в этих органеллах, оказалась достаточно близка к Ca^{2+}-зависимой индукции PTP в митохондриях, выделенных из некоторых других растительных объектов, например, из корней пшеницы [10]. В частности, интактные митохондрии корней пшеницы, как и митохондрии люпина, в ходе дыхания активно поглощали экзогенный Ca^{2+} и транспорт этого катиона зависел от присутствия в среде инкубации P_i. Далее, наступление анаэробиоза в среде инкубации митохондрий сопровождалось быстрой диссипацией $\Delta\Psi$ и выделением из матрикса поглощенных ионов Ca^{2+} [10]. При этом, в отсутствие экзогенного кальция одна только аноксия была не способна индуцировать PTP в митохондриях пшеницы. Кроме того, при низких микромолярных концентрациях Ca^{2+} его накопление в матриксе и индукция PTP не сопровождались набуханием митохондрий пшеницы и выходом из них цитохрома *c*. Сопоставление этих данных с результатами, представленными в этой работе, позволяет заключить, что закономерности индукции и регуляции активности PTP в митохондриях корней пшеницы во многом схожи с аналогичными

предпосылками открытия разобщающего канала в митохондриях семядолей люпина, т.е. накоплением в матриксе ионов Ca^{2+} и возникновением условий анаэробиоза. В этой связи высказывается предположение, что в условиях анаэробиоза увеличивается чувствительность PTP к основным ее регуляторам [10, 26, 27]. Однако, конкретный механизм подобной сенсибилизации PTP низким уровнем кислорода, например, к ионам Ca^{2+} остается невыясненным.

Как уже отмечалось во введении, особенностью интактных митохондрий, выделенных из ряда растительных объектов, например, стеблей гороха и клубней картофеля, а также митохондрий некоторых дрожжей является отсутствие или низкая активность унипортера (MCU), обеспечивающего транспорт экзогенного Ca^{2+} в матрикс [9, 12, 22, 23]. Вследствие этого, для увеличения уровня Ca^{2+} в таких митохондриях используются Ca^{2+}-ионофоры, например, ETH129 или A23. Интересно, что катализируемое ETH129 накопление Ca^{2+} в митохондриях стеблей гороха приводило к индукции PTP и сопровождалось диссипацией $\Delta\Psi$, но не вело к изменению объема матрикса, а в митохондриях клубней картофеля использование очень высоких (милимолярных) концентраций экзогенного Ca^{2+} индуцировало PTP и высокоамплитудное набухание органелл [9, 12]. В митохондриях дрожжей *Endomyces magnusii* открытие PTP и диссипация $\Delta\Psi$ при накоплении Ca^{2+} в присутствии ETH129 также не сопровождалась набуханием матрикса, она совпадала по времени с наступлением аноксии и могла быть легко обращена дополнительной аэрацией суспензии органелл [23]. Подобные особенности в “поведении” и механизмах регуляции PTP, отражающие функционирование поры в различных состояниях свидетельствуют, по-видимому, о многообразии функций PTP в митохондриях дрожжей, растений и животных.

Хотя в отношении молекулярной структуры PTP продолжаются дебаты, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* давно установлено, что этот канал в митохондриях животных может функционировать в двух основных состояниях или подсостояниях (высокой и низкой проводимости) [4, 28]. Основные характеристики, механизмы регуляции и функциональное значение PTP в состоянии высокой проводимости или “классической PTP” хорошо известны и многократно описаны, в том числе для митохондрий растений [1–3, 7, 27]. Поэтому, более подробно рассмотрим особенности работы PTP в состоянии низкой проводимости, которое, как нам представляется, характерно для митохондрий растений и, возможно, некоторых дрожжей. Основными характеристиками этого состояния PTP являются: легкая, иногда спонтанная, обратимость индукции, отсутствие высокоамплитудного набухания матрикса и нарушения целостности мембран, проницаемость канала только для протонов и небольших катионов (K^+, Na^+), включая, по-видимому, ионы Ca^{2+} [4, 28]. Судя по имеющейся литературе, часть из которой была приведена выше, PTP в митохондриях растений и некоторых дрожжей, если ее активность удается обнаружить, по-видимому, также может функционировать в двух состояниях – высокой и низкой проводимости. При этом, следует отметить, что открытие PTP в состоянии высокой проводимости, например, в митохондриях клубней картофеля, сопровождающееся высокоамплитудным набуханием, нарушением целостности внешней мембраны органелл и выходом из них цитохрома *c* достигалось только при использовании высоких или очень высоких (миллимолярных) концентраций экзогенного Ca^{2+} [8, 9]. Трудно сказать, насколько реально достижение подобных, пусть даже локальных, концентраций ионов Ca^{2+} в цитозоле клетки. Вместе с тем, нельзя полностью исключать возможность того, что в физиологических условиях свойства MCU могут существенно изменяться под влиянием целого семейства различных белков-регуляторов, образующих единый комплекс с этим переносчиком [24]. В недавней работе итальянских ученых были приведены характеристики функционирования PTP в митохондриях стеблей проростков гороха [12]. Как уже отмечалось, в этих митохондриях отсутствовали, или были неактивны, переносчики, катализирующие импорт экзогенного Ca^{2+}, поэтому, был использован ETH129, обеспечивающий возможность электрофоретического транспорта и накопления этого катиона в матриксе, а также индукцию PTP. Подобно митохондриям животных PTP в этих органеллах индуцировалась Ca^{2+}, прооксидантами (диамидом), окислителями SH групп белков (фениларсен-оксидом) и ингибировалась Mg-АДФ, указывая на существование общих компонентов в механизме регуляции канала. Вместе с тем были обнаружены и существенные особенности функционирования PTP в митохондриях гороха, которые, с другой стороны, сближают их с митохондриями люпина. Основными из них являются отсутствие набухания органелл, а также ее низкая чувствительность к ЦсА и высокая – к антиоксидантам и ДТТ [12]. Анализируя полученные результаты авторы высказывают предположение, что в митохондриях гороха PTP представляет собой АТФазу, точнее Ca^{2+}-АТФазу, которая в ходе длительной эволюции приобрела дополнительную функцию, благодаря чему она может использоваться в качестве канала, обеспечивающего быстрый выход из матрикса ионов Ca^{2+} [12].

Для выяснения физиологической роли PTP действительно важным является вопрос о способности транспортировать из матрикса ионы Ca^{2+},

при функционировании этого канала в состоянии низкой проводимости. К сожалению, этот вопрос пока не решен окончательно даже для митохондрий животных, хотя многие исследователи считают, что именно благодаря этому свойству PTP митохондрии способны играть ключевую роль в гомеостатировании уровня Ca^{2+} в цитозоле клеток, принимать активное участие в Ca^{2+} сигналинге, а также защищать органеллы от критического повышения уровня АФК и Ca^{2+} в матриксе [4, 29–31]. Полученные в данной работе результаты также оставляют этот вопрос открытым, хотя было показано, что пермеабилизация внутренней мембраны митохондрий семядолей люпина, вследствие открытия PTP, сопровождалось довольно быстрым выходом из матрикса накопленного Ca^{2+}. Тем не менее, эта скорость была существенно ниже, чем в присутствии Ca^{2+}-ионофора, а, кроме того, выход Ca^{2+} мог быть связан с активацией или демаскированием (в результате торможения энергозависимого импорта Ca^{2+}) других транспортных механизмов, например, Ca^{2+}/Na^{+} или Ca^{2+}/H^{+} антипортеров, катализирующих экспорт этого катиона из митохондрий животных и растений. В этой связи следует отметить, что в митохондриях животных (печень, сердце) выход накопленного Ca^{2+} из митохондрий с участием указанных переносчиков происходит с низкой скоростью (5–10 нмолей Ca^{2+}/(мин/мг белка)), которая в 100–500 раз ниже, чем скорость поглощения Ca^{2+} катализируемая MCU. Вследствие этого необходимость существования механизма, обеспечивающего возможность быстрого выброса Ca^{2+} из матрикса митохондрий достаточно очевидна и это может быть одной из функций PTP (т.е. в качестве Ca^{2+}-канала) [3, 29].

В заключение следует отметить, что сопоставление полученных результатов с данными о функционировании Ca^{2+}-зависимой PTP в митохондриях растений и некоторых дрожжей, позволяет утверждать, что аналогичный механизм, регулирующий проницаемость внутренней мембраны, существует в митохондриях семядолей люпина. Открытие PTP в состоянии низкой проводимости в этих органеллах легко обратимо, не чувствительно к ЦсА, сопровождается деполяризацией мембраны и индуцируется при повышении в матриксе уровня ионов Ca^{2+}, а также при возникновении условий анаэробиоза. Безусловно, необходимы дополнительные исследования для выяснения конкретных механизмов транспорта Ca^{2+}, а также его роли в регуляции функциональной активности митохондрий растений, включая индукцию PTP. В этой связи, митохондрии семядолей люпина представляются, на наш взгляд, перспективным объектом, поскольку выяснение указанных вопросов может проводиться на интакных органеллах.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Azzolin L., von Stockum S., Basso E., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P.* The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 2504. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.023
2. *Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G.* The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology // Physiol. Rev. 2015. V. 95. P. 111. https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015
3. *Vercesi A., Castilho R.F., Kowaltowski A., de Oliveira H.C.F., de Souza-Pinto N.C., Figuella T.R., Busanello E.N.B.* Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition // Free Radical Biol. Med. 2018. V. 129. P. 1. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiolmed.2018.08.034
4. *Ichas F., Mazat J.-P.* From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1366. P. 33.
5. *Sileikyte J., Forte M.* The mitochondrial permeability transition in mitochondrial disorders // Oxidative medicine and cellular longevity. 2019. art. ID 3403075. https://doi.org/10.1155/2019/3403075
6. *Tajeddine N.* How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilisation? // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1860. P. 1079. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.013
7. *Zancani M., Casolo V., Petrussa E., Peresson C., Patui S., Bertolini A., De Col V., Braidot E., Boscuttiand F., Vianello A.* The permeability transition in plant mitochondria: the missing link // Front.Plant Sci. 2015. V. 6. Art. 1120. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01120
8. *Fortes F., Castilho R.F., Catisti R., Carnieri E., Vercesi A.E.* Ca^{2+} induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species // J. Bioenerg. Biomembr. 2001. V. 33. P. 43. https://doi.org/10.1023/A:1005672623709
9. *Arpagaus S., Rawyler A., Braendle R.* Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 1780. https://doi.org/10.1074/jbc.M109416200
10. *Virolainen E., Blokhina O., Fagersted K.* Ca^{2+}-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anox-

ic stress // Ann. Bot. 2002. V. 90. P. 509. https://doi:101093/aob/mcf221

11. *Martins I.*S., *Vercesi A.E.* Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985. V. 129. P. 943. https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)91982-5
12. *De Col V., Petrussa E., Casolo V., Braidot E., Lippe G., Filippo A., Peresson C., Bertolini A., Giorgio V., Checcgttto V., Vianello A., Bernardi P., Zancani M.* Properties of the permeability transition of pea steam mitochondria // Front. Physiol. 2018. V. 9. P. 1626. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01626
13. *Petrussa E., Casolo V., Peresson C., Braidot E., Vianello A., Macri F.* The K^+ ATP channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria // Mitochondrion. 2004. V. 3. P. 297. https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.01.002
14. *Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Шугаева Н.А.* Салициловая кислота индуцирует протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий семядолей люпина // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 765. https://doi.org/10.7868/S0015330316060099
15. *Буцанец П.А., Шугаева Н.А., Шугаев А.Г.* Влияние мелатонина и салициловой кислоты на генерацию АФК митохондриями семядолей люпина // Физиология растений. 2021. Т. 68. С. 421. https://doi.org/10.31857/S0015330321040035
16. *Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Андреев И.М., Шугаева Н.А.* Влияние салициловой кислоты на метаболическую активность митохондрий растений // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 555. https://doi.org/10.7868/S0015330314040186
17. *Chance B., Williams G.R.* The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. 1956. V. 17. P. 65.
18. *Bredford M.M.* A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quatities of protein utilizing the principle of protein-die binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
19. *Moore A.L., Bonner W.D.* Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranine method // Plant Physiol. 1982. V. 70. P. 415. https://doi.org/10.1104/pp.70.5.1271
20. *Scarpa A.* Measurements of cation transport with metallochromic indicators // Met. Enzymol. 1979. V. 56. P. 301. https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)56030-3
21. *Silva M.A.P., Carnieri E.G.S., Vercesi A.* Calcium transport by corn mitochondria // Plant Physiol. 1992. V. 98. P. 452. https://doi.org/10.1104/pp.98.2.452
22. *Curtis M.J., Wolpert T.J.* The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death // Plant J. 2002. V. 23. P. 295. http://doi.org/101046/j.0960-7412.2001.01213.x
23. *Deryabina Y.I., Bazhenova E.N., Saris N.-E.L., Zvyagilskaya R.A.* Ca^{2+} efflux in mitochondria from the yeast *Endomyces magnusii* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 47801. https://doi.org/10.1074/jbc.M103685200
24. *Wagner S., De Bortoli S., Schwarzlander M., Szabo I.* Regulation of mitochondrial calcium in plants versus animals // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 3809. https://doi.org/10.1093/jxb/erw100
25. *Akerman K.E.G., Moore A.L.* Phosphate dependent, ruthenium red insensitive Ca^{2+} uptake in mung bean mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. V. 114. P. 1176. https://doi.org/10.1016/0006-291x(83)90686-1
26. *Blokhina O.B., Chirkova T.V., Fagerstedt K.V.* Anoxic stress leads to hydrogen peroxid**e** formation in plant cells // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 1179. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.359.1179
27. *Chavez E., Melendes E., Zazueta C., Reyes-Vivas H., Perales S.G.* Membrane permeability transition as induced by dysfunction of the electron transport chain // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. V. 41. P. 961. https://doi.org/10.1080/15216549700202021
28. *Bernardi P.* The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? // Front. Fhysiol. 2013. V. 4. Art. 95. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00095
29. *Bernardi P., Petronilli V.* The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal // J. Bioenerg. Biomembr. 1996. V. 28. P. 131. https://doi.org/10.1007/BF02110643
30. *Huser J., Blatter L.* Fluctuation in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore // Biochem J. 1999. V. 343. P. 311. https://doi.org/10.1042/bj3430311
31. *De Marchi E., Bonora M., Giorgi C., Pinton P.* The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux // Cell Calcium. 2014. V. 56. P. 1. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.03.004

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 382–391

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

БЕЛОК МЕМБРАННЫХ НАНОДОМЕНОВ FLOT1 УЧАСТВУЕТ В ОБРАЗОВАНИИ РАННИХ ЭНДОСОМ В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ *A. thaliana*[1]

© 2023 г. Л. А. Халилова[a], *, А. С. Воронков[a]

[a] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия*

**e-mail: lhalilova@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.01.2023 г.
После доработки 06.02.2023 г.
Принята к публикации 06.02.2023 г.

Растения в ходе всей своей жизни подвергаются различным стрессовым воздействиям. Плазматическая мембрана – основной компартмент клетки, отвечающий за адаптацию растений к стрессу и способный ремоделировать состав входящих в нее белков посредством эндоцитоза. Основным путем эндоцитоза у растений служит клатрин-зависимый эндоцитоз, но кроме него также известны несколько альтернативных, клатрин-независимых путей эндоцитоза. Одним из белков, участвующих в таком эндоцитозе, является Flot1. В данном исследовании на модельной системе корней проростков *A. thaliana* дикого типа и нокаут-мутанта (*Atflot1ko*) методами световой микроскопии с флуоресцентным липофильным зондом FM4-64 и электронной микроскопии была исследована роль Flot1 в процессе эндоцитоза. Одновременная обработка корней проростков ингибитором клатринового эндоцитоза (1-нафталинуксусной кислотой) и агентом, обедняющим плазмалемму по стеринам (метил-β-циклодекстрином), блокировала эндоцитоз в клетках корней дикого типа. Вследствие этого, наблюдалось снижение везикуляции цитоплазмы (ранних эндосом, мелких везикул, образованных агранулярным эндоплазматическим ретикулумом, и микровакуолей из его фрагментов, а также клатриновых везикул) как в контрольном варианте, так и в условиях стресса – при внесении в среду 100 мМ NaCl. При этом у мутанта *Atflot1ko* происходило замыкание цистерн комплекса Гольджи в кольцо с полным блокированием процесса формирования ранних эндосом. Таким образом, полученные результаты наводят на мысль, что при действии ингибиторов на клетки корней *A. thaliana* присутствующий в микродоменах плазматической мембраны белок Flot1 сохраняет структуру комплекса Гольджи и его способность к формированию на транс-стороне ранних эндосом, а также принимает участие в образовании ранних эндосом из транс-Гольджи сети.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, клатрин-зависимый эндоцитоз, метил-β-циклодекстрин, 1-нафталинуксусная кислота, ультраструктура клеток, флотиллин

DOI: 10.31857/S0015330323600067, **EDN:** QAHCTE

ВВЕДЕНИЕ

В течение всей своей жизни клетки постоянно сталкиваются со случайными и сложными изменениями в окружающей среде. Ярким примером такого действия является солевой стресс. Отклонения от гомеостатических условий часто неблагоприятны для клеточной жизни и вызывают различные стрессовые реакции, что обеспечивает адаптацию и выживание клеток в неблагоприятных условиях [1]. Плазматическая мембрана (ПМ) считается центральным компартментом в клеточной адаптации к разным стрессовым условиям, поскольку она является барьером между внутренней и внешней средой клеток [2]. Динамическое ремоделирование ПМ является важнейшим процессом клеточной адаптации к различным стрессовым условиям. Регулируемый обмен молекулами и сигналами через ПМ достигается с помощью трансмембранных белков – таких как каналы, транспортеры и рецепторы [3]. Белки удаляются из ПМ путем интернализации мембранных участков в везикулы при эндоцитозе [4]. Внутри эндосом этот материал затем сортируется для деградации или рециркулируется обратно на поверхность клетки. Переработанные белки вместе с вновь синтезированными секретируются в виде транспортных пузырьков для пополнения функциональной популяции бел-

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600067 для авторизованных пользователей.

Сокращения: НУК – 1-нафталинуксусная кислота, МβЦД – метил-β-циклодекстрин, ПМ – плазмалемма, ТГС – транс-Гольджи сеть, РЭ – ранние эндосомы, КГ – комплекс Гольджи, МВ – микровакуоли, ПП – переплазматическое пространство, КЗЭ – клатрин-зависимый эндоцитоз, КНЗЭ – клатрин-независимый эндоцитоз.

ков плазматической мембраны [5]. У растений описано несколько вариантов эндоцитоза, обусловленных специфическим набором белков в различных местах вдоль эндоцитарного пути [4]. Наиболее заметным из них считают клатрин-зависимый эндоцитоз (КЗЭ), при котором на ПМ образуются впячивания с высокой концентрацией белков, подлежащих транспортировке [6]. Результатом инвагинации мембраны является образование пузырьков, покрытых клатрином, которые затем нацеливаются на перенос груза (карго) в эндосомальные компартменты [7]. Значительная часть зарождающихся пузырьков может не созреть, тем самым блокируя процесс поглощения и переноса груза. КЗЭ – строго регулируемый процесс, ориентированный только на перенос груза.

На сегодняшний день наиболее широко используемый метод визуализации и количественной оценки скорости эндоцитоза – использование липофильного красителя FM4-64, который флуоресцирует только при связывании с мембранами и легко проникает в клетки корней посредством эндоцитоза, что позволяет оценить потоки мембранного транспорта [8–10]. Эксперименты по отслеживанию эндоцитоза FM4-64 показывают, что нарушение КЗЭ с использованием доминантно-негативной формы клатрина резко снижает общую интернализацию материала ПМ, поэтому данный путь может быть преобладающим в клетках растений. Было обнаружено, что КЗЭ функционирует во всех клетках корня *A. thaliana*, что указывает на его глобальное значение в физиологии растений [11, 12].

Ингибиторы КЗЭ дрожжей и животных также являются мощными ингибиторами эндоцитоза растений [11, 13]. Они препятствуют взаимодействию между белками-грузами и клатрин-рекрутинговыми адаптерными белковыми комплексами в растениях, тем самым блокируя процесс КЗЭ [14]. Неспецифически воздействуя на КЗЭ, ауксины могут увеличивать свой собственный отток, стабилизируя мембранные белки (например, PIN) и, следовательно, организуя свой полярный транспорт в тканях [15, 16]. Различные эффекты ауксинов на транспорт PIN в клетке были получены при использовании его изоформ, преимущественно 1-нафталинуксусной кислоты (НУК) [15–17].

Большинство изученных до сих пор трансмембранных белков следуют по клатрин-зависимому пути поглощения, который действует во всех клеточных слоях корня *A. thaliana* [12, 16, 18]. Однако в растениях существуют альтернативы КЗЭ. Независимый от клатрина путь, нацеленный на закрепленные на мембране, но не трансмембранные белки, был описан в клетках эпидермиса корней *A. thaliana* при стандартных условиях роста [12]. В то же время обнаружено, что солевой стресс индуцирует другой независимый от клатрина путь для трансмембранных и мембраносвязанных (заякоренных GPI) белков, на который влияет сортировка вакуолярных белков фактора АДФ-рибозилирования, т.е фактора обмена гуанидина (ARF-GEF) 6. Данный факт согласуется с тем, что независимый от клатрина эндоцитоз белка плазмалеммы – трансмембранного аквапорина 2;1 (PIP2;1) – усиливался при солевом стрессе [12, 19]. Таким образом, тип эндоцитоза, которому будет подвергаться растительный белок, не является фиксированным и может зависеть от множества факторов, таких как положение клетки, состояние ее развития и сигналы/стимулы, факторы окружающей среды. Одним из клатрин-независимых путей эндоцитоза (КНЗЭ) является флотиллин-опосредованный эндоцитоз. Мембранные рафты ПМ, богатые сфинголипидами и холестерином, представляют собой упорядоченные микродомены с уникальным белком флотиллином (Flot1). Нокдаун флотилина-1 ингибирует поглощение GPI-связанных белков [20]. Мембранный микродомен-ассоциированный эндоцитоз с помощью Flot1, обнаруженный у *A. thaliana*, участвует в регуляции передачи сигнала посредством эндоцитоза [19, 21–23]. Ранее нами было показано, что у мутанта со сверхэкспрессией гена *flot1* наблюдалось снижение числа диктиосом в комплексах Гольджи (КГ) и их деформация с образованием кольцеобразных структур на транс-стороне КГ, что было особенно заметно в условиях засоления. Такие изменения КГ также могут отражать активирование везикулярного транспорта и ускоренное расходование материала транс-стороны КГ на образование эндосом [24]. Хотя функции флотиллинов у растений исследованы в значительно меньшей степени, чем у представителей других царств, их участие в ряде процессов тоже было показано. Однако есть данные об очень низкой частоте образования инвагинаций, связанных с Flot1, что согласуется с отсутствием действия истощения флотилина на скорость эндоцитоза холерного токсина [25].

КНЗЭ заякоренных GPI-белков в клетках животных критически зависит от содержания стеринов в мембране [26]. Предварительная обработка корней проростков метил-β-циклодекстрином (МβЦД) – соединением, обедняющим ПМ растений по стеринам [19, 27], снижает поглощение FM4-64 в эпидермальных клетках корня *A. thaliana* [12]. МβЦД может выводить стерины из ПМ, тем самым способствуя МβЦД-индуцированному истощению мембраны, что, в свою очередь, приводит к ослаблению динамики фосфорилирования, димеризации и интернализации растительных белков [28].

Целью данной работы было показать участие белка Flot1 в образовании ранних эндосом (РЭ) на транс-стороне комплекса Гольджи. Для дости-

жения данной цели были проведены исследования с ингибиторами эндоцитоза на клетках корней проростков *A. thaliana* дикого типа (ДТ) и его нокаут-мутанта по гену *flot1*, а также изучена ультраструктура клеток корней этих растений при действии на них данных ингибиторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Работу выполняли на растениях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Col-0) ДТ и его нокаут-мутанте *Atflot1ko* (SALK_205125C). Данные о вставке и характеристика мутанта были показаны нами ранее [29]. 5-дневные проростки *A. thaliana* ДТ и нокаут-мутанта *Atflot1ko* как для FM-окрашивания, так и для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) были выращены на агаризованной ½ МС-среде с 0.5% сахарозой при температуре 23 ± 2°C, относительной влажности воздуха 70 ± 5%, фотопериоде 16 ч/сут и интенсивности света 80 мкмоль квантов/м^2 с, полученного от люминесцентных ламп ЛБ-80 (“Philips”, Польша).

FM4-64 окрашивание. В ходе эксперимента 5-дневные проростки инкубировали в 1 мл жидкой ½ МС-среде (без 0.5% сахарозы, pH 5.8). В контрольном варианте опыта проростки инкубировали с эндоцитозным красителем FM4-64 (2 мкМ) при комнатной температуре в течение 30 мин. В опытном варианте в среду инкубации одновременно с красителем вносили 100 мМ NaCl. Далее проростки переносили на предметное стекло и визуализировали с помощью микроскопа AxioImager Z2 (“Carl Zeiss”, Германия). Изображения получали с помощью монохромной высокочувствительной камеры AxioCamMRm (“Carl Zeiss”, Германия) в программе AxioVision 4.8. Флуоресценцию FM4-64 (красный псевдоцвет) детектировали, используя наборы фильтров №14 (λ_{ex} 510–560 нм, λ_{em} > 590 нм; “Carl Zeiss”, Германия). Средняя интенсивность пикселей цитозольной стороны клеток, исключая плазматическую мембрану, были измерены с помощью программы ZEN Blue (“Carl Zeiss”, Германия). Для анализа использовали не менее 50 снимков в каждой точке.

Обработка корней НУК и МβЦД. 5-дневные проростки инкубировали в 1 мл жидкой ½ МС-среде (без 0.5% сахарозы, pH 5.8) с добавлением 100 мкМ НУК (“Sigma”, #N1641, Великобритания) и прединкубировали в течение 30 мин. Далее в инкубирующий раствор добавляли 2 мкМ FM4-64 при комнатной температуре и продолжали инкубацию еще 30 мин. В опытном варианте в среду инкубации вместе с FM4-64 добавляли 100 мМ NaCl. При одновременной обработке проростков НУК и МβЦД в раствор ½ МС-среды добавляли 100 мкм НУК и 10 мМ МβЦД (“Sigma”, #128446-36-6, Китай) и прединкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Далее все так же, как при обработке НУК. Обработка изображений была такая же, как при окрашивании FM4-64.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Изучение ультраструктуры клеток корней проростков *A. thaliana* ДТ и нокаут-мутанта *Atflot1ko* проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы подготавливали в соответствии со стандартной методикой [24]. Кусочки корней (2–3 мм) для ТЭМ были вырезаны на расстоянии 1–2 мм от кончика корня. Образцы фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида в течение 3 ч и далее постфиксировали в 1% OsO_4 при 4°C в течение одних суток. Фиксирующие растворы готовили на основе 0.05 М какодилатного буфера, pH 7.2. После фиксации образцы обезвоживали в спиртах (30 и 40% – 2 раза по 15 мин; 50 и 60% – 2 раза по 30 мин; 70% – на ночь при 4°C). На следующий день образцы переносили в 96% этанол – 1 ч; 100% этанол : 100% ацетон – 1 : 1 (об/об) – 1 ч; 100% ацетон – 1 ч и далее в смесь эпоксидной смолы (“Fluka”, cat. № 2920114, Германия) и ацетона в соотношении 1 : 8, 1 : 4, 1 : 1 (об/об). После полимеризации образцов с помощью ультрамикротома Om U3 (“Reihert”, Австрия) были получены ультратонкие срезы. Для просмотра в ТЭМ LIBRA 120 (“Carl Zeiss”, Германия) срезы помещали на сетки и контрастировали 1% уранилацетатом.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для мониторинга общего эндоцитоза, протекающего в клетках корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana* ДТ и его нокаут-мутанта *(Atflot1ko),* мы проанализировали внутриклеточное накопление эндоцитарного индикатора FM4-64, гидрофобные молекулы которого поглощаются клетками корня путем связывания с липидами ПМ. Поглощенный краситель интернализуется с помощью эндоцитозных пузырьков [30].

Интенсивность флуоресценции FM4-64 в клетках корня у *Atflot1ko* в зоне растяжения была в 2 раза больше, чем у ДТ, как в отсутствие соли, так и при внесении 100 мМ NaCl в среду (рис. 1; Дополнительные материалы, рис. 1). Внесение NaCl в среду инкубирования не оказало влияния на скорость интернализации красителя у ДТ и у *Atflot1ko*, что согласуется с данными, полученными нами ранее [28]. Инкубация проростков в раство-

ре, содержащем 2 мкМ FM4-64, привела к заметному эндоцитозу красителя клетками корня *Atflot1ko* в исследуемой зоне.

Анализ влияния НУК на эндоцитоз в клетках корней проростков исследуемых нами линий *A. thaliana* показал, что в корнях ДТ, предобработанных раствором 100 мкМ НУК, и в отсутствие соли в среде ингибирование эндоцитоза составило 70%. Внесение в среду инкубации 100 мМ NaCl возвращало значения интенсивности флуоресценции FM4-64 у растений ДТ до контрольных значений (рис. 1). Следует отметить, что клеточные мембраны оставались очерченными FM4-64, поэтому доступ красителя ко всем клеткам корня не нарушался обработкой корней НУК (Дополнительные материалы, рис. 1).

Обработка корней проростков *Atflot1ko* 100 мкМ НУК ингибировала эндоцитоз FM4-64 в клетках на 35% в условиях отсутствия соли в среде. Внесение NaCl в среду инкубации не оказало действия на интернализацию красителя клетками корней проростков и оставалось на том же уровне, что и в контроле (рис. 1).

Одновременная обработка корней проростков растений *A. thaliana* ДТ и нокаут-мутанта НУК и МβЦД (агентом, вымывающим стерины из ПМ), способствовала сильному снижению сигнала флуоресценции маркера FM4-64. Совместное действие этих двух агентов на клетки корня проростков ДТ в контрольных условиях привело к снижению сигнала FM4-64 на 84% от контрольных значений, а у нокаут-мутанта – на 82% в аналогичных условиях. Внесение в среду 100 мМ NaCl также приводило к ингибированию сигнала флуоресценции на 76% у ДТ и на 75% у нокаут-мутанта по сравнению с контролем (рис. 1; Дополнительные материалы, рис. 1). Общий эффект ингибирования сохранялся у обеих линий. Кроме того, поглощение FM4-64, которое было невосприимчивым к обработке НУК в клетках корней ДТ в условиях засоления, было значительно снижено в ответ на одновременное действие двух агентов (рис. 1; Дополнительные материалы, рис. 1). Одновременная обработка корней НУК и МβЦД блокировала все вызванные солью увеличения поглощения FM4-64 у ДТ.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Изучение ультраструктуры клеток корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana* ДТ и его нокаут-мутанта по гену *flot1 (Atflot1ko)* в исследуемой нами зоне растяжения как в контрольных условиях, так и в условиях стресса (100 мМ NaCl) (рис. 2а–в) показало отсутствие различий с морфологией структур клеток зоны поглощения, которая была описана нами ранее [29]. Обработка ауксином корней проростков ДТ в контрольных условиях привела к выраженному уменьшению кривизны ПМ (рис. 2ж–и) и ее плотному прилеганию к клеточной стенке, за исключением редких участков скопления экзосом (Экз) между ПМ и периплазматическим пространством (ПП) (рис. 2з). ТГС активно формировала РЭ на транс-стороне (рис. 2з). Действие НУК сказалось и на структуре хорошо развитого эндоплазматического ретикулума (ЭР), имеющего в контроле форму разветвленных трубочек (рис. 2а–е), которое привело к расширению просветов и переходу из трубчатой формы в форму цистерн, а затем и к его фрагментированию. Мелкие фрагменты ЭР образовывали множество микровакуолей (МВ) угловатой формы (рис. 2и). Наблюдалась повышенная извилистость тонопласта (рис. 2ж–и), что, по-видимому, связано с усилением потока транспорта везикул в сторону вакуоли и увеличением общей площади мембраны. Активное состояние ТГС в условиях контроля демонстрировало усиление везикуляции цитоплазмы в целом (рис. 2з, и) и активацию процесса экзоцитоза в клетках корней проростков при ингибировании КЗЭ. В корнях растений ДТ, не обработанных ауксином, в условиях отсутствия соли в среде такой сильной везикуляции не наблюдалось (рис. 2а–в).

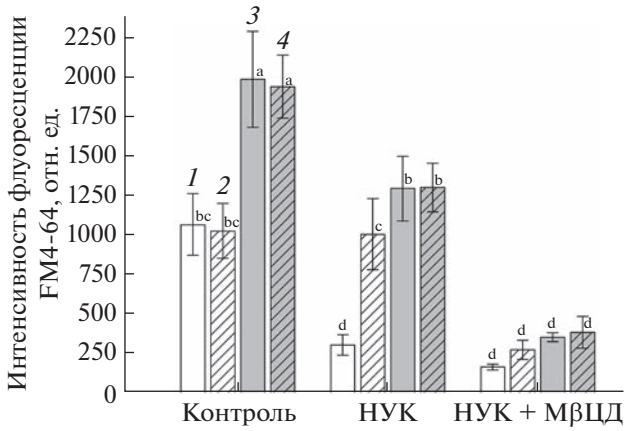


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции FM4-64 в клетках корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana: 1* – дикий тип, 0 мМ NaCl; *2* – дикий тип, 100 мМ NaCl; *3* – *Atflot1ko*, 0 мМ NaCl; *4* – *Atflot1ko*, 100 мМ NaCl. Контроль – FM4-64, 2 мкМ; НУК – 100 мкМ; МβЦД – 10 мМ.

При внесении в среду инкубации 100 мМ NaCl наблюдались некоторые изменения ультраструктуры клеток. Обработка ауксином в этих условиях деформировала ТГС с образованием полукольцеобразных структур (рис. 2л, м), однако на транс-стороне КГ активно формировались РЭ крупных размеров (рис. 2л), по сравнению с контролем. Просветы ЭР были также расширены, фрагментированных участков ЭР в цитоплазме не наблюдалось (рис. 2м). Уменьшение общей везикуляции и вакуолизации цитоплазмы при обработке корней ДТ 100 мМ NaCl является результатом снижения интенсивного образования везикул и

активирования экзоцитоза в сторону вакуоли (рис. 2к–м). При этом в условиях засоления и отсутствия ауксина в среде инкубирования в клетках корней проростков ДТ наблюдалась повышенная вакуолизация цитоплазмы (рис. 2г–е).

Изучение ультраструктуры клеток нокаут-мутанта, обработанных НУК, показало, что мутация *Atflot1* не выявила особых различий между контрольными и опытными вариантами растений. Тем не менее, в условиях отсутствия соли в среде в клетках корня нокаут-мутанта наблюдалось отсутствие извилистости ПМ и ее плотное прилегание к клеточной стенке, кроме редких участков скопления Экз в ПП (рис. 3ж–и, и-(вставка)). ТГС дефомировались с образованием кольцеобразных структур (рис. 3ж, з) по сравнению с аналогичными условиями инкубации корней проростков ДТ (рис. 2ж–и). На транс-стороне КГ формировались единичные эндосомы. Просветы ЭР были расширены, при этом сам ЭР не был фрагментирован (рис. 3з, и). Цитоплазма клеток не была вакуолизирована. Внесение NaCl в среду инкубирования и обработка проростков нокаут-мутанта НУК не привело к заметным ультраструктурным изменениям (рис. 3к–м) по сравнению с контрольными условиями (рис. 3ж–и). Однако, следует отметить, что в условиях засоления ТГС полностью замыкалась в кольцо, тем самым блокируя образование РЭ на транс-стороне. В аналогичных условиях, но без обработки НУК, КГ сохраняли структуру и процесс образования РЭ на транс-стороне был ярко выражен (рис. 3г–е).

Обработка корней проростков ДТ одновременно НУК и МβЦД не привела к заметным изменениям в ультраструктуре клеток – они были аналогичны действию ауксина на корни. В условиях отсутствия соли в среде КГ активно отшнуровывал от транс-стороны РЭ (рис. 2н–п). Расширение ЭР, его фрагментация и образование мелких МВ неправильной формы вызвало усиление везикуляции и вакуолизации цитоплазмы (рис. 2н–п). Внесение в среду 100 мМ NaCl имело аналогичное действие на структуру клеток корня ДТ, как и при действии только НУК в условиях засоления (рис. 2р–т). Следует отметить, что у растений ДТ изменение ультраструктуры КГ наблюдалось только в условиях засоления как при обработке НУК, так и при одновременной обработке НУК и МβЦД.

Совместная обработка корней нокаут-мутанта НУК и МβЦД в контрольных условиях приводила в целом к увеличению везикуляции и вакуолизации цитоплазмы за счет образования более крупных РЭ на транс-стороне КГ и увеличению просветов ЭР с образованием МВ неправильной формы (рис. 3н–п). В условиях засоления выраженная везикуляция цитоплазмы снижалась, ТГС замыкались в кольцо, активности на их транс-стороне не происходило (рис. 3с). Фрагментации и расширения просветов ЭР не наблюдалось (рис. 3т), в отличие от варианта, когда корни были обработаны только НУК (рис. 3м).

Таким образом, все описанные изменения ультраструктуры клеток корней были вызванны скорее действием НУК, чем двойным действием агентов. Добавление в среду инкубации NaCl приводило к уменьшению вакуолизации цитоплазмы клеток корня как у ДТ, так и у нокаут-мутанта.

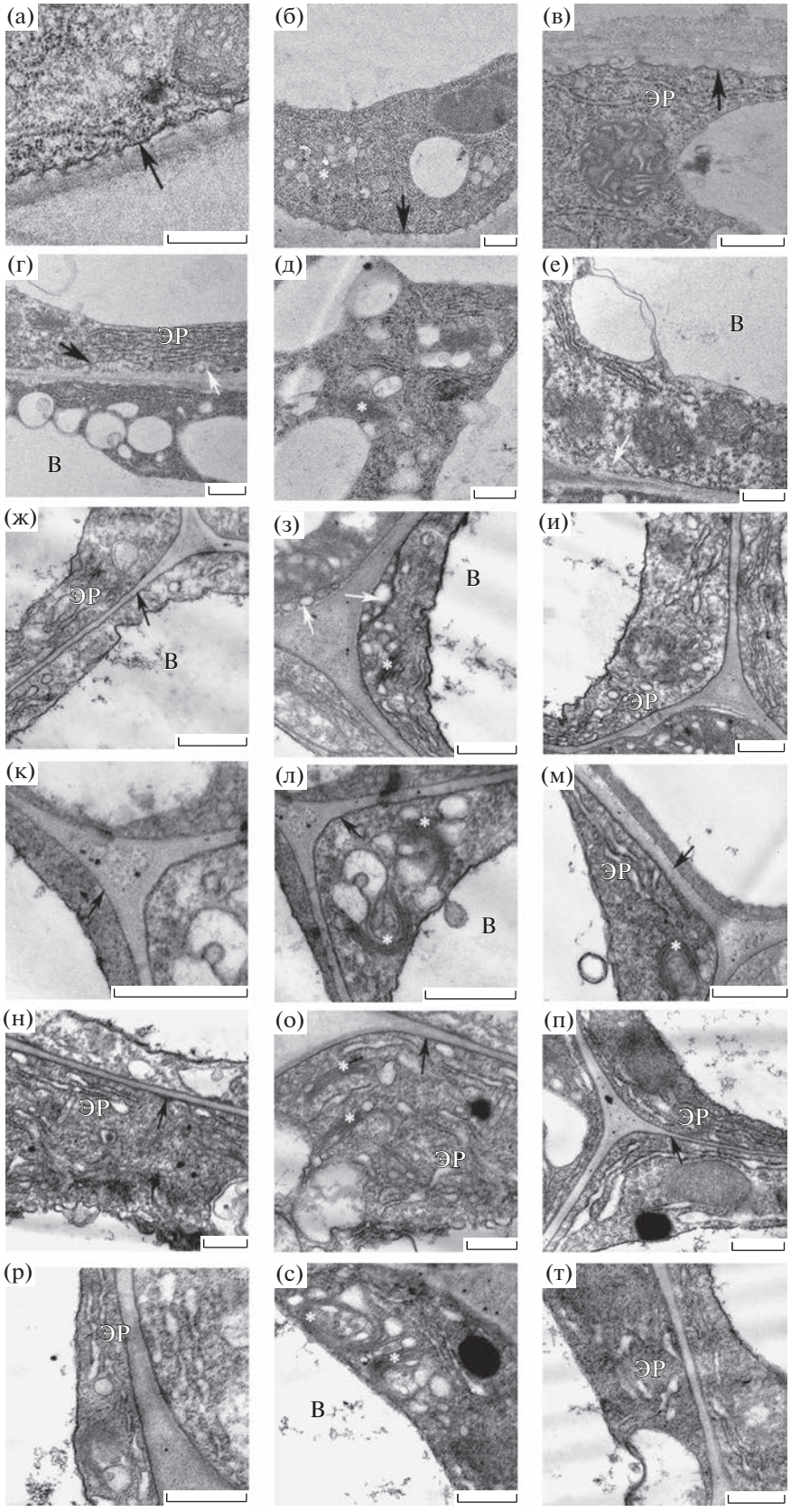
ОБСУЖДЕНИЕ

Мембранный транспорт у эукариот включает сложную сеть транспортных систем везикул, идущих во многих направлениях и соединяющих практически каждый внутриклеточный компартмент. По большей части, внутренний транспорт опосредован клатрином, тогда как транспортные везикулы, происходящие из ПМ, могут иметь различное происхождение. Эти эндоцитарные пузырьки, как правило, имеют разные размеры (60–200 нм) [30, 31]. После формирования везикулы сливаются и обмениваются грузом в пре-вакуолярном компартменте, в том числе и в ТГС/РЭ [32, 33].

Ранее нами было показано, что в зоне поглощения в клетках корня ДТ и нокаут-мутанта не было выявлено различий в скорости поглощения зонда FM4-64 как в контрольном варианте, так и в присутствии NaCl в среде [29]. Исследования показали, что в разных зонах корня, а также в различных слоях клеток корня протекают разные процессы эндоцитоза (клатрин-зависимые и клатрин-независимые) [12]. В данной работе исследования были проведены в зоне растяжения корня. Известно, что в зоне роста (растяжения) клетки сильно удлиняются путем растяжения. Интенсивность данного процесса во всей зоне роста не одинаковая и своего максимума достигает в центральной части. Для этих процессов необходим постоянный активный транспорт веществ и мембранного материала, который доставляется в результате везикулярного транспорта (эндо- и экзоцитоза), идущего в обоих направлениях в клетке.

Единственным хорошо охарактеризованным эндоцитарным путем в растениях является кла-

Рис. 2. Ультраструктура клеток корней 5-дневных проростков дикого типа растений *A. thaliana:* а–в – 0 мМ NaCl; г–е – 100 мМ NaCl; ж–и – 0 мМ NaCl + 100 мкМ НУК; к–м – 100 мМ NaCl + 100 мкМ НУК; н–п – 0 мМ NaCl + + 100 мкМ НУК + 10 мМ МβЦД; р–т – ДТ 100 мМ NaCl + 100 мкМ НУК + 10 мМ МβЦД. ЭР – эндоплазматический ретикулум, В – вакуоль, белая звездочка – транс-Гольджи сеть/ранние эндосомы, черная стрелка – плазматическая мембрана, белая стрелка – экзосомы. Масштаб – 0.5 мкм.


(а)
(б)
(в)
ЭР
(г)
ЭР
В
(д)
(е)
В
(ж)
ЭР
В
(з)
В
(и)
ЭР
(к)
(л)
В
(м)
ЭР
(н)
ЭР
(о)
ЭР
(п)
ЭР
(р)
ЭР
(с)
В
(т)
ЭР

трин-зависимый путь, в основном из-за доступности специфических химических ингибиторов – НУК, Tyr-A23, HUB1 [11, 18]. Каждый из этих агентов эффективно блокирует поглощение большинства трансмембранных белков (PIN2, LTI6b, PIN1), подтверждая, что эти белки поглощаются исключительно клатрин-зависимым путем. Было показано, что этот путь действует конститутивно во всех слоях корня [12].

Для выявления эффектов ауксина на транспорт везикул предпочтительно используется синтетическая форма НУК из-за ее более высокой стабильности по сравнению с природным ауксином, индол-3-уксусной кислотой (ИУК) [15, 16]. Ауксины влияют на эндоцитоз, а точнее на клатрин-зависимый эндоцитоз, что подтверждено ауксин-опосредованным ингибированием интернализации эндоцитарного индикатора FM4-64 [8] и снижением его сигнала в клетках [15, 16]. Показано, что при добавлении 100 мкМ НУК в среду инкубации практически отсутствует внутриклеточный сигнал FM4-64 [34]. В нашей работе такая концентрация НУК вызвала максимальный эффект ингибирования КЗЭ в клетках обоих исследуемых линий растений (рис. 1; Дополнительные материалы, рис. 1). Обработка проростков ДТ ауксином привела к сильному ингибированию КЗЭ (на ≈70%), тогда как эффект ингибирования этого процесса у нокаут-мутанта составил ≈15% (рис. 1). Вероятно, КЗЭ в клетках корней нокаут-мутантов является доминирующим, и полное ингибирование данного процесса в клетках корней мутантных растений могло бы привести к нарушению транспортных функций клетки в целом. При этом не исключено, что у данных растений существуют альтернативные пути КНЗЭ, в котором не участвует Flot1 (например, рецептор-опосредованный эндоцитоз). Отсутствие усиления сигнала в ответ на внесение в среду ингибирования 100 мМ NaCl в клетках корней нокаут-мутанта подтверждает данные об усилении КНЗЭ в условиях засоления с участием белка Flot1 [19, 21].

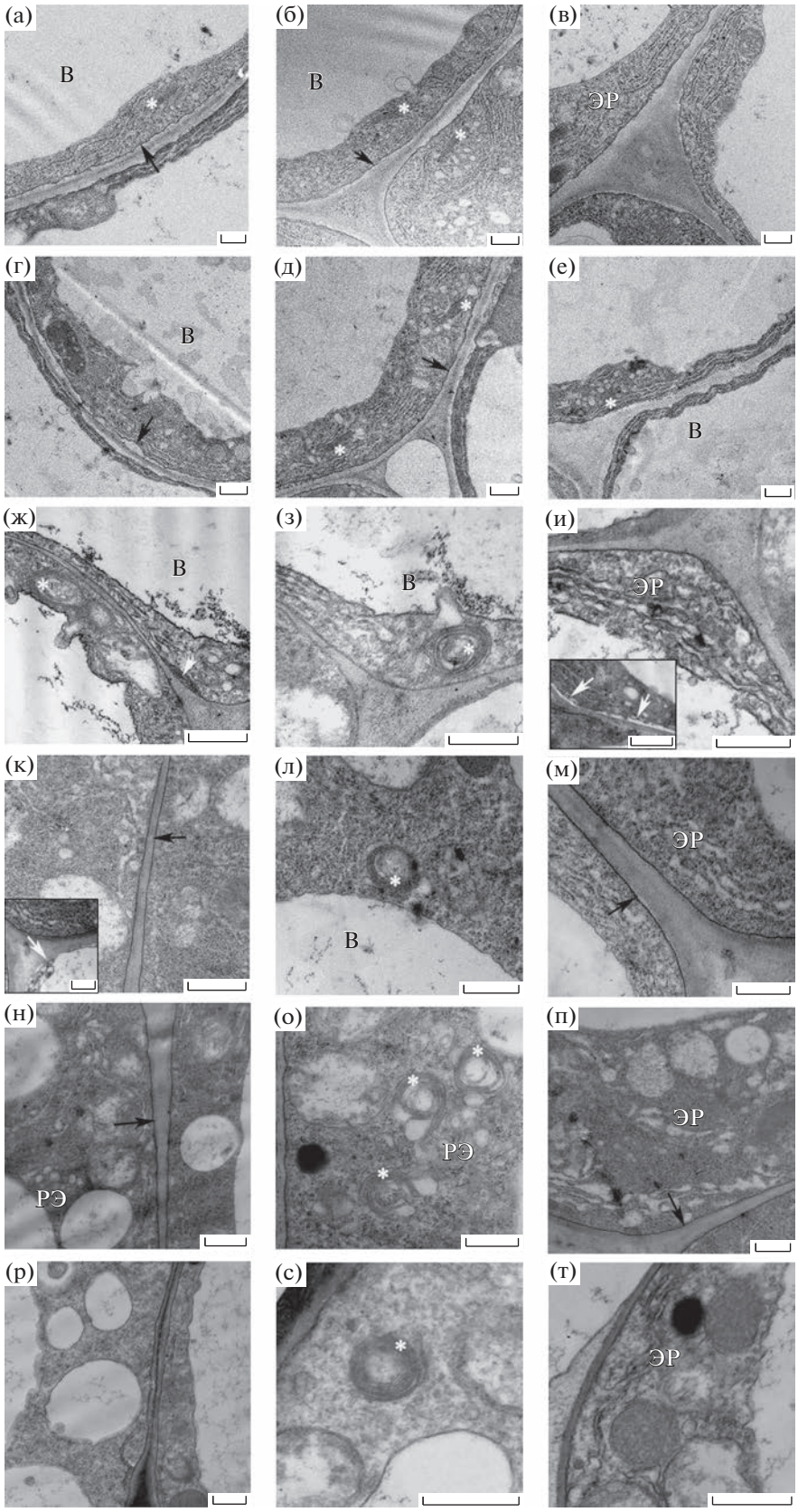
Использование ТЭМ показало, что обработка проростков НУК привела к изменению ультраструктуры клеток как у ДТ, так и у нокаут-мутанта (рис. 2ж–м, 3ж–м). По-видимому, НУК в высокой концентрации (100 мкМ) эффективно ингибирует КЗЭ и оказывает сильное влияние на эндомембранную систему, в том числе и на ее морфологию (деформация ТГС, фрагментация ЭР). Действие ауксина в контрольных условиях привело к скоплению Экз в ПП (рис. 3з), что, в свою очередь, указывает на активный процесс экзоцитоза, протекающий в клетках корней ДТ. Усиление сигнала FM4-64 в клетках корней ДТ в условиях засоления, по-видимому, происходит за счет перераспределения потоков везикулярного транспорта (активации КНЗЭ и направления экзоцитоза в сторону вакуоли).

В клетках корней растений *A. thaliana* клатрин-зависимый и клатрин-независимый пути эндоцитоза действуют повсеместно [12]. Показано, что обработка кончиков корней растений *A. thaliana* ауксинами снижала скорость КЗЭ и ингибировала поглощение мембранного белка PIP2;1 [19, 21, 35]. Однако следует отметить, что эндоцитоз PIP2;1 также происходит независимо от клатрина через нанодомен-опосредованный путь. Действительно, при солевом стрессе (100 мМ NaCl) совместная локализация между PIP2;1 с нанодоменным постоянным белком Flot1 увеличивалась [19]. Это согласуется с нашими данными по ингибиторному анализу эндоцитоза с НУК у ДТ и усиления сигнала FM4-64 при добавлении NaCl в среду (рис. 1).

Одновременное внесение НУК и МβЦД в среду инкубирования проростков ДТ блокировало все индуцированные солью увеличения поглощения FM4-64. Внесение NaCl в среду не приводило к увеличению внутриклеточного сигнала маркера. Это наблюдение указывает на то, что все дополнительные и индуцированные различными факторами пути эндоцитоза чувствительны к тому или иному из этих реагентов.

Микродомены мембран, обогащенные стеринами и сфинголипидами, могут модулировать локализацию и активность определенных мембранных белков [36]. Флотиллины были обнаружены в мембранных рафтах ПМ у *A. thaliana*, что указывает на его потенциальную связь с доменами, богатыми стеринами [21]. Известно, что флотиллины в составе рафтов входят в состав детергент-устойчивых мембран (ДУМ). Показано, что обработка фракции ДУМ МβЦД, выделенной в градиенте сахарозы [37], приводит к истощению фитостеринов и удалению плавающей фракции ДУМ из градиента плотности сахарозы, что, скорее всего, связано с нарушением свойств ДУМ [38], при этом глобальный белковый состав ПМ после обработки МβЦД сохранялся [27]. По-видимому, истощение свободного фитостерина из ПМ клеток после обработки корней МβЦД приводит к полному удалению фракции ДУМ и, в некоторой степени, к нарушению гетерогенности мембраны, в част-

Рис. 3. Ультраструктура клеток корней 5-дневных проростков нокаут-мутанта *A. thaliana:* а–в – 0 мМ NaCl; г–е – 100 мМ NaCl; ж–и – 0 мМ NaCl + 100 мкМ НУК; к–м – 100 мМ NaCl + 100 мкМ НУК; н–п – 0 мМ NaCl + 100 мкМ НУК + + 10 мМ МβЦД; р–т – ДТ 100 мМ NaCl + 100 мкМ НУК + 10 мМ МβЦД. ЭР – эндоплазматический ретикулум, В – вакуоль, белая звездочка – транс-Гольджи сеть/ранние эндосомы, черная стрелка – плазматическая мембрана, белая стрелка – экзосомы. Масштаб – 0.5 мкм.


(а)
В
(б)
В
(в)
ЭР
(г)
В
(д)
(е)
В
(ж)
В
(з)
В
(и)
ЭР
(к)
(л)
В
(м)
ЭР
(н)
РЭ
(о)
РЭ
(п)
ЭР
(р)
(с)
(т)
ЭР

ности богатых стерином доменов. Таким образом, фитостерины в ПМ клеток, возможно, являются ключевыми соединениями для структурирования липидных рафтов путем упорядочивания ацильной цепи липидов и продвижения их в качестве платформ рекрутирования мембранных белков, в состав которых входит и Flot1. Таким образом, наблюдаемые нами изменения в ультраструктуре клеток исследуемых линий растений *A. thaliana* (деформация ТГС, фрагментация ЭР), обработанных отдельно ауксином и одновременно НУК с МßЦД, могут быть объяснены изменениями в уровнях и/или составе свободных стеринов в мембранах в целом.

Одновременная обработка корней нокаут-мутантов ауксином и МßЦД оказала сильное ингибирующее действие на КЗЭ. Изучение ультраструктуры клеток растений *Atflot1ko*, обработанных одновременно двумя агентами, показало, что небольшое количество РЭ и МВ в цитоплазме клеток, наблюдаемых в условиях отсутствия соли в среде, полностью исчезло при внесении в среду 100 мМ NaCl. Вероятно, засоление среды приводит к быстрому слиянию образовавшихся в цитоплазме клеток РЭ между собой и/или с вакуолью, а также к полному замыканию цистерн КГ в кольцо, что, в свою очередь, блокирует процесс образования РЭ на транс-стороне.

Нами показано, что наличие в микродоменах ПМ клеток корней белка Flot1 сохраняет структуру КГ и его способность к формированию на транс-стороне РЭ при ингибировании КЗЭ и обработке корней МßЦД как в контрольных условиях, так и при засолении. При этом аналогичное действие ауксина и МßЦД на клетки корней нокаут-мутанта сильно деформировало структуру ТГС. Внесение в среду NaCl приводило к полному блокированию способности ТГС формировать везикулы на транс-стороне. Таким образом, мы можем утверждать, что функционирование микродоменного белка ПМ Flot1 сохраняет структуру КГ в клетках корней *A. thaliana* и принимает участие в образовании РЭ из ТГС.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации (№ темы 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. *Rodas-Junco B.A., Racagni-Di-Palma G.E., Canul-Chan M., Usorach J., Hernández-Sotomayor S.M.T.* Link between lipid second messengers and osmotic stress in plants // IJMS. 2021. V. 22. P. 2658. https://doi.org/10.3390/ijms22052658
2. *López-Hernández T., Haucke V., Maritzen T.* Endocytosis in the adaptation to cellular stress // Cell Stress. 2020. V. 4. P. 230. https://doi.org/10.15698/cst2020.10.232
3. *Ivanov R., Vert G.* Endocytosis in plants: Peculiarities and roles in the regulated trafficking of plant metal transporters // Biol. Cell. 2021. V. 113. P. 1. https://doi.org/10.1111/boc.202000118
4. *Paez Valencia J., Goodman K., Otegui M.S.* Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. Ann. Rev. Plant Biol. 2016. V. 67. P. 309. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112242
5. *Fan L., Li R., Pan J., Ding Z., Lin J.* Endocytosis and its regulation in plants // Trends Plant Sci. 2015. V. 20. P. 388. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.014
6. *Kaksonen M., Roux A.* Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. V. 19. P. 313. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132
7. *Reynolds G.D., Wang C., Pan J., Bednarek S.Y.* Inroads into Internalization: five years of endocytic exploration // Plant Physiol. 2018. V. 176. P. 208. https://doi.org/10.1104/pp.17.01117
8. *Jelínková A., Malínská K., Simon S., Kleine-Vehn J., Pařezová M., Pejchar P., Kubeš M., Martinec J., Friml J., Zažímalová E., Petrášek J.* Probing plant membranes with FM dyes: tracking, dragging or blocking? // Plant J. 2010. V. 61. P. 883. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04102.x
9. *Gadeyne A., Sánchez-Rodríguez C., Vanneste S., Di Rubbo S., Zauber H., Vanneste K., Van Leene J., De Winne N., Eeckhout D., Persiau G., Van De Slijke E., Cannoot B., Vercruysse L., Mayers J.R., Adamowski M., et al.* The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants // Cell. 2014. V. 156. P. 691. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.039
10. *Estevez J.M.* Plant cell expansion. Methods and protocols // MIMB. 2015. V. 1242. P. 59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1902-4
11. *Dhonukshe P., Aniento F., Hwang I., Robinson D.G., Mravec J., Stierhof Y.-D., Friml J.* Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis* // Curr. Biol. 2007. V. 17. P. 520. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.052
12. *Baral A., Irani N.G., Fujimoto M., Nakano A., Mayor S., Mathew M.K.* Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in *Arabidopsis* root // Plant Cell. 2015. V. 27. P. 1297. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00154
13. *Boutte Y., Jonsson K., McFarlane H.E., Johnson E., Gendre D., Swarup R., Friml J., Samuels L., Robert S., Bhalerao R.P.* ECHIDNA-mediated post-Golgi trafficking of auxin carriers for differential cell elongation // Proc. Nat. Acad. Sci. 2013. V. 110. P. 16259.
14. *Ortiz-Zapater E., Soriano-Ortega E., Marcote M.J., Ortiz-Masiá D., Aniento F.* Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A // Plant J. 2006. V. 48. P. 757. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02909.x
15. *Paciorek T., Zažímalová E., Ruthardt N., Petrášek J., Stierhof Y.D., Kleine-Vehn J., Morris D.A., Emans N.,*

Jürgens G., Geldner N., Friml J. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells // Nature. 2005. V. 435. P. 1251. https://doi.org/10.1038/nature03633

16. *Robert S., Kleine-Vehn J., Barbez E., Sauer M., Paciorek T., Baster P., Vanneste S., Zhang J., Simon S., Čovanová M., Hayashi K., Dhonukshe P., Yang Z., Bednarek S.Y., Jones A.M., et al.* ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis* // Cell. 2010. V. 143. P. 111. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.027
17. *Abas L., Benjamins R., Malenica N., Paciorek T., Wisniewska J., Moulinier-Anzola J.C., Sieberer T., Friml J., Luschnig C.* Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism // Nat. Cell Biol. 2006. V. 8. P. 249.
18. *Kitakura S., Vanneste S., Robert S., Löfke C., Teichmann T., Tanaka H., Friml J.* Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 1920.
19. *Li X., Wang X., Yang Y., Li R., He Q., Fang X., Luu D.T., Maurel C., Lin J.* Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 3780. https://doi.org/10.1105/tpc.111.091454
20. *Glebov O.O., Bright N.A., Nichols B.J.* Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells // Nat. Cell. Biol. 2006. V. 8. P. 46.
21. *Li R., Liu P., Wan Y., Chen T., Wang Q., Mettbach U., Baluška F., Šamaj J., Fang X., Lucas W.J., Lin J.* A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 2105. https://doi.org/10.1105/tpc.112.095695
22. *Zhang L., Xing J., Lin J.* At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants // New Phytol. 2019. V. 224. P. 1479. https://doi.org/10.1111/nph.16018
23. *Cao Y., He Q., Qi Z., Zhang Y., Lu L., Xue J., Li J., Li R.* Dynamics and endocytosis of Flot1 in *Arabidopsis* require CPI1 function // IJMS. 2020. V. 21. P. 1552. https://doi.org/10.3390/ijms21051552
24. *Khalilova L.A., Sergienko O.V., Orlova Y.V., Myasoedov N.A., Karpichev I.V., Balnokin Y.V. Arabidopsis thaliana* mutant with t-DNA insertion in the Flot1 (At5g25250) gene promotor possesses increased resistance to NaCl // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 275. https://doi.org/10.1134/S1021443720020077
25. *Saslowsky D.E., Cho J.A., Chinnapen H., Massol R.H., Chinnapen D.J., Wagner J.S., De Luca H.E., Kam W., Paw B.H., Lencer W.I.* Intoxication of zebra fish and mammalian cells by cholera toxin depends on the flotillin/reggie proteins but not Derlin-1 or -2 // J. Clin. Invest. 2010. V. 120. P. 4399.
26. *Chadda R., Howes M.T., Plowman S.J., Hancock J.F., Parton R.G., Mayor S.* Cholesterol-sensitive cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway // Traffic. 2007. V. 8. P. 702. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00565.x
27. *Roche Y., Gerbeau-Pissot P., Buhot B., Thomas D., Bonneau L., Gresti J., Mongrand S., Perrier-Cornet J., Simon-Plas F.* Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts // FASEB J. 2008. V. 22. P. 3980. https://doi.org/10.1096/fj.08-111070
28. *Xue Y., Xing J., Wan Y., Lv X., Fan L., Zhang Y., Song K., Wang L., Wang X., Deng X., Baluška F., Christie J.M., Lin J. Arabidopsis* blue light receptor phototropin 1 undergoes blue light-induced activation in membrane microdomains // Mol. Plant. 2018. V. 11. P. 846. https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.04.003
29. *Khalilova L.A., Lobreva O.V., Nedelyaeva O.I., Karpichev I.V., Balnokin Y.V.* Involvement of the membrane nanodomain protein, AtFlot1, in vesicular transport of plasma membrane H^+-ATPase in *Arabidopsis thaliana* under salt stress // IJMS. 2023. V. 24. P. 1251. https://doi.org/10.3390/ijms24021251
30. *Bolte S., Talbot C., Boutte Y., Catrice O., Read N.D., Satiat-Jeunemaitre B.* FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells // J. Microsc. 2004. V. 214. P. 159.
31. *Mayor S., Parton R.G., Donaldson J.G.* Clathrin-independent pathways of endocytosis // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2014. V. 6. a016758. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016758
32. *Šamaj J., Read N.D., Volkmann D., Menzel D., Baluška F.* The endocytic network in plants // Trends Cell Biol. 2005. V. 15. P. 425. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.06.006
33. *Lam S.K., Tse Y.C., Jiang L., Oliviusson P., Heinzerling O., Robinson D.G.* Plant prevacuolar compartments and endocytosis // Plant Cell Monographs. 2005. P. 37. https://doi.org/10.1007/7089_004
34. *Narasimhan M., Gallei M., Tan S., Johnson A., Verstraeten I., Li L., Rodriguez L., Han H., Himschoot E., Wang R., Vanneste S., Sánchez-Simarro J., Aniento F., Adamowski M., Friml J.* Systematic analysis of specific and nonspecific auxin effects on endocytosis and trafficking // Plant Physiol. 2021. V. 186. P. 1122. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab134.
35. *Martinière A., Fiche J.B., Smokvarska M., Mari S., Alcon C., Dumont X., Hematy K., Jaillais Y., Nollmann M., Maurel C.* Osmotic stress activates two reactive oxygen species pathways with distinct effects on protein nanodomains and diffusion // Plant Physiol. 2019. V. 179. P. 1581. https://doi.org/10.1104/pp.18.01065
36. *Feraru E., Friml J.* PIN polar targeting // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1553.
37. *Danielsen E.M., Hansen G.H.* Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2003. V. 1617. P. 1.
38. *dos Santos S.M., Weber C.C., Franke C., Muller W.E., Eckert G.P.* Cholesterol: coupling between membrane microenvironment and ABC transporter activity // Biochem. BioPhys. Res. Commun. 2007. V. 354. P. 216.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 392–401

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И СОДЕРЖАНИЯ ИНУЛИНА В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ *Cichorium intybus* L. *in vitro*

© 2023 г. Е. А. Калашникова[a], *, Р. Н. Киракосян[a], В. И. Трухачев[a], М. Г. Панкова[a], А. В. Сумин[a]

[a] *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимиряева", Москва, Россия*

**e-mail: kalash0407@mail.ru*

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.
После доработки 24.01.2023 г.
Принята к публикации 24.01.2023 г.

Получены каллусные культуры *in vitro* цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) и исследованы их ростовые и биохимические особенности в зависимости от гормонального состава МС-среды и спектрального состава света. Изучение влияния светокультуры на формирование каллусной ткани и накопление в ней инулина проводили в светонепроницаемых гроутентах с излучением выровненным по плотности потока фотосинтетических фотонов и различным соотношением его уровней в области 660 нм (R – красный) и 730 нм (FR – дальний красный). Контрольный вариант размещали под белыми линейно-люминесцентными лампами. Полученные культуры характеризовались высокой пролиферативной активностью и способностью к морфогенезу. Установлено, что взаимодействие двух факторов – присутствие в составе питательной среды ауксинов (ИУК или НУК в концентрации 7.5 мг/л в сочетании с БАП 0.5 мг/л) и культивирование в условиях светокультуры (FR > R, FR = R, FR < R) – оказало существенное влияние на биосинтетический потенциал культур клеток. В полученных культурах проведено исследование количественного содержания инулина. Показано, что высокое содержание инулина (7.55–7.95%) в каллусных культурах было характерно при выращивании на МС-среде в сочетании с ИУК при режиме освещения FR > R. Вероятно, это обусловлено тем, что именно в этих условиях формировалась хорошо пролиферирующая и высокоморфогенная каллусная ткань. Полученные результаты подтверждают выдвинутую гипотезу о специфичности культивируемых клеток *in vitro* синтезировать и накапливать вторичные метаболиты в дедиффенцированных клетках и зависимости этого процесса от факторов химической и физической природы.

Ключевые слова: *Cichorium intybus*, гормоны роста, инулин, каллусогенез, спектральный состав света

DOI: 10.31857/S0015330322600802, **EDN:** PZCOVA

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время уделяется большое внимание развитию фарминдустрии, одним из приоритетных направлений которой является производство качественных лекарственных препаратов. Основное требование, предъявляемое к препаратам – их безопасность и высокая эффективность действия. Источником производства таких препаратов могут служить растительные объекты, в частности, лекарственные растения, позволяющие расширить ассортимент лечебных средств [1–3]. Кроме того, такое производство позволит получать конкурентоспособные импортозамещающие лекарственные препараты, что будет способствовать успешной реализации Государственной программы Российской Федерации "Развитие здравоохранения". В соответствии с прогнозом ВОЗ, через 15–20 лет доля фитопрепаратов в общем ассортименте лекарственных средств может возрасти до 60% [4]. Данный прогноз объясняется стратегией ВОЗ в области народной медицины 2014–2023 гг.

Интерес исследователей к лекарственным растениям постоянно растет, так как они являются источником биологически активных веществ, которые могут широко применяться не только в фарминдустрии, но и в пищевой промышленности. В настоящее время особое внимание уделяется производству продуктов питания диетического и функционального назначения, в состав которых входят, например, пищевые волокна, антиоксиданты, пребиотики и др. [5]. Одним из эффективных пребиотиков является инулин, который содержится в таких растениях как цикорий (*Cichorium intybus* L.), топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.), девясил (*Inula helenium* L.) и др. Однако для промышленного производства инулина используют *C. intybus* [6], а основные производители – Германия, Бельгия и Китай. Поэтому необходимо пересмотреть системы управления производством и

получать отечественную конкурентоспособную продукцию высокого качества.

Инулин представляет собой гетерогенный набор полимеров фруктозы. Он состоит из глюкозильных фрагментов и повторяющегося фруктозильного фрагмента, которые связаны между собой β-2,1-связями [7]. Степень полимеризации (DP) стандартного инулина колеблется от 2 до 60 [8, 9]. Из-за наличия β-2,1-связей инулин не расщепляется ферментами пищеварительной системы человека, что способствует его функциональным свойствам: пониженной калорийности и пребиотическим эффектом [10].

Цикорий обыкновенный (*C. intybus* L.) – многолетнее травянистое растение семейства Астровые (Asteraceae), широко распространенное в Азии и Европе [11, 12], используемое в промышленности в качестве сырья для производства инулина и биологически активных соединений. Различные части растения являются источником таких соединений, как алкалоиды, сесквитерпеновые лактоны, кумарины, витамины, ненасыщенные стерины, флавоноиды, сапонины и дубильные вещества [13–16]. Согласно данным Meehye и Shin (1996) [17], в свежих корнях цикория обычно содержится 68% инулина, 14% сахарозы, 5% целлюлозы, 6% белка, 4% золы и 3% других соединений, в то время как в сушеных корнях цикория содержание инулина возрастает до 98% и только 2% приходится на все остальные соединения. Цикорий традиционно используют для лечения гипертермии различной этиологии, диареи, желтухи и выведения камней из желчного пузыря [18, 19], а также сообщается, что растение обладает мощным гепатопротекторным, антиоксидантным, гипогликемическим, мочегонным, антитестикулярным и иммуномодулирующим действием [20–24]. Кроме того, его корни после обжаривания и измельчения часто используют в качестве заменителя кофе или добавки к кофе, особенно в Средиземноморском регионе Индии и Южной Африке [25].

Применение методов биотехнологии, в частности культуры клеток, органов и тканей высших растений, позволяет не только размножать и получать высококачественный посадочный материал, но и создавать культуры клеток *in vitro* редких, исчезающих и лекарственных растений, с повышенным содержанием целевого вещества [26]. Что касается цикория, то такие исследования *in vitro* малочисленны. Основное внимание уделяется технологии клонального микроразмножения с целью получения растений-регенерантов из различных частей цикория. Так, например, в литературе приводятся данные о зависимости регенерации растений из каллусной ткани, полученной из листовых [27–33] и черешковых [34, 35] эксплантов, от гормонального состава питательной среды. Как правило, в качестве индукторов каллусо- и морфогенеза применяют БАП, ИУК или НУК в различных концентрациях и соотношениях [29–31, 33]. Другим абиотическим фактором, который оказывает влияние на процесс фотосинтеза, развитие и морфогенез растений [36], регулирует первичный и вторичный метаболизм – является свет. Экспериментальные данные ряда авторов показывают зависимость синтеза вторичных метаболитов от спектрального состава света, особенно длинноволновой (красной) области. Что касается цикория, то аналогичные исследования ранее не были проведены.

Цель настоящей работы – получение каллусной культуры *C. intybus* с разной степенью дифференциации (морфогенной и каллусной) и исследование особенностей их роста и накопления инулина в зависимости от гормонального состава питательной среды и условий освещения *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения культуры *in vitro* цикория (*C. intybus* L.) использовали семена элитной репродукции сорта Петровский (урожай 2019 г.), селекции Ростовской опытной станции.

Семена стерилизовали 0.1% раствором $HgCl_2$ в течение 9 мин, трижды промывали стерильной дистиллированной водой [33] и высевали в чашки Петри диаметром 90 мм на агаризованную МС-среду [37] без добавления регуляторов роста. pH МС-среды доводили до 5.6–5.8 перед автоклавированием. Чашки Петри помещали на стеллажи под белые линейно-люминесцентные лампы (OSRAM AG, Германия) (интенсивность освещения 150 мкмоль/м^2 с) и проращивали при температуре 23 ± 1°C и 16-часовом световом дне.

В дальнейшем 16-дневные проростки пересаживали в культуральные сосуды объемом 200 мл на МС-среду, дополненную 1.0 мг/л БАП (Merck, Германия) и 0.1 мг/л ИУК (Merck, Германия) для формирования асептических растений с правильной морфологией.

Все работы по стерилизации семян, введению в культуру *in vitro*, по изучению каллусогенеза и морфогенеза проводили в асептических условиях ламинарного бокса (BIOBASE BBS-H1800(X), КНР).

Каллусную ткань получали из листовых эксплантов, изолированных с 30-дневных асептических растений, на МС-среде, дополненной регуляторами роста – БАП (2.0 мг/л) в сочетании с различными ауксинами НУК, ИУК и 2,4-Д (Merck, Германия) в концентрации 5.5–9.5 мг/л. Выращивание каллусной культуры осуществляли в чашках Петри с диаметром 90 мм, при освещении белыми линейнолюминесцентными лампами (OSRAM AG, Германия), (интенсивность освещения 150 мкмоль/м^2 с) и 16-часовом световом дне.

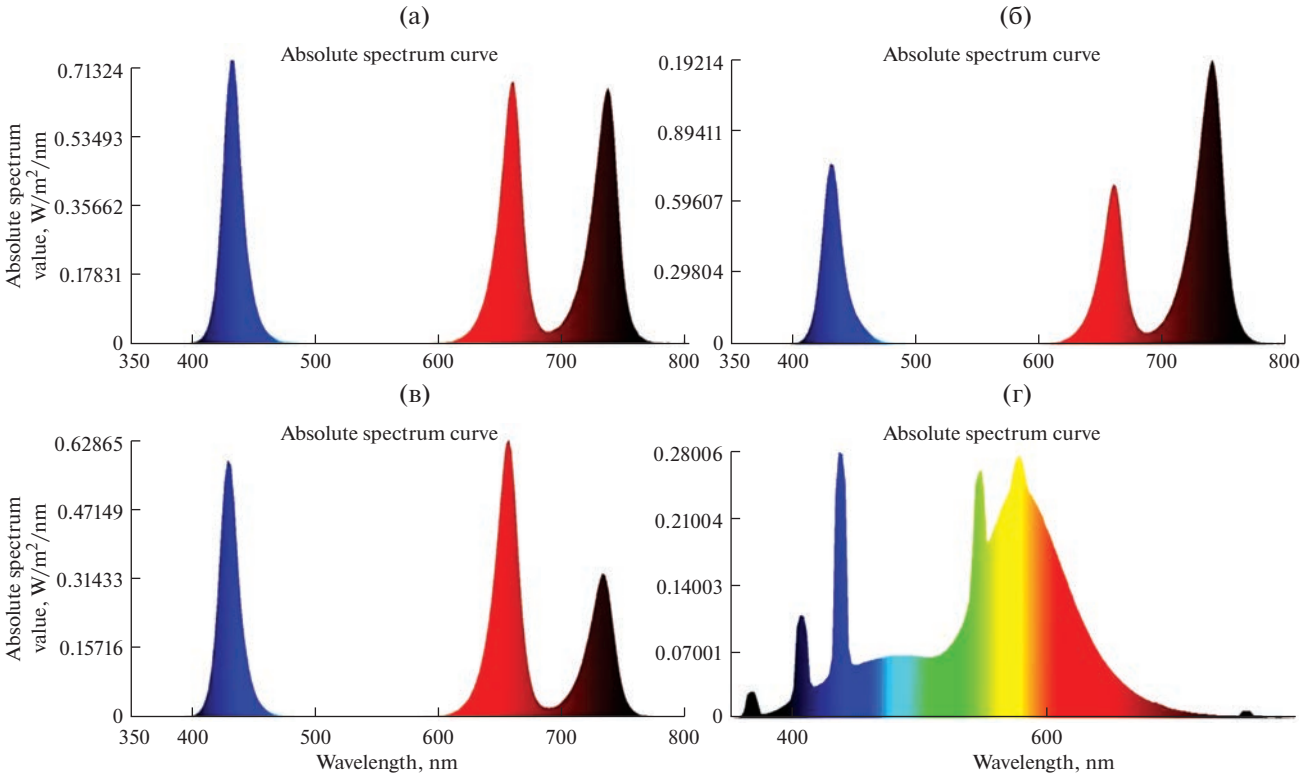


Рис. 1. Варианты соотношения R/FR: (а) – R = FR, (б) – R < FR, (в) – R > FR, (г) – контроль (люминесцентные лампы). Спектры излучения получены с помощью прибора PLA-20 (Everfine, KHP).

Каждые 4 недели каллусную ткань пересаживали на свежую питательную среду. При этом учитывали структуру и цвет каллусной ткани. Интенсивность роста каллусной ткани определяли по ее массе (мг). Для этого осуществляли взвешивание ткани в условиях ламинар-бокса в начале и в конце цикла выращивания. Биомассу каллусной ткани определяли на аналитических весах (AND GR-202, Япония). На основании полученных результатов вычисляли прирост каллусной культуры на 28 сутки культивирования (Gr) (IV и V циклы выращивания). Для расчетов использовали следующую формулу: $Gr = X_{max}/X_0$, где X_{max} и X_0 – максимальное и начальное значения сырой массы каллусной ткани.

Изучение влияния светокультуры на формирование каллусной ткани и накопление в ней инулина проводили в светонепроницаемых гроутентах (Urban Grower, Россия) с излучением выровненным по плотности потока фотосинтетических фотонов и различным соотношением его уровней в области 660 нм (R – красный) и 730 нм (FR – дальний красный) (FR > R, FR = R, FR < R). Контрольный вариант размещали под белыми линейно-люминесцентными лампами (OSRAM AG, Германия) (интенсивность освещения 150 мкмоль/м^2 с) (рис. 1). Каллусную ткань получали из сегментов листьев 30-дневных асептических растений цикория, на агаризованной МС-среде с добавлением 2.0 мг/л БАП в сочетании с 7.5 мг/л НУК или 7.5 мг/л ИУК. Выращивание каллусной культуры осуществляли в чашках Петри с диаметром 90 мм, при температуре 23 ± 1°C и 16-часовом световом дне.

Варианты соотношения R/FR:

(1) R/FR = 1, плотность потока фотосинтетических фотонов (PPFD) = 142 ± 10 мкмоль/м^2 с;

(2) R/FR = 1/2, PPFD = 142 ± 10 мкмоль/м^2 с;

(3) R/FR = 2, PPFD = 142 ± 10 мкмоль/м^2 с;

(4) Контроль: белая линейно-люминесцентная лампа (OSRAM AG, Германия), PPFD 40 ± ± 10 мкмоль/м^2 с.

Спектры излучения измеряли с помощью прибора PLA-20 (Everfine, KHP).

Количественный анализ инулина в каллусных культурах определяли методом спектрофотометрии [38]. Анализ проводили на высушенном материале. Биомассу всех полученных культур высушивали в сушильном шкафу при температуре 50°C в течение 24 ч. Для одного анализа брали сухой образец каллуса в количестве 600 мг, помещали в мерную колбу, заливали 9.5 мл 90% этанола и выдерживали в течение 30 мин на водяной бане (BioSan, Латвия) при температуре 80°C, периоди-

чески перемешивая его содержимое. В качестве контроля к образцу каллуса добавляли такой же объем воды. После охлаждения в обе колбы (пробную и контрольную) добавляли 0.05 мл 25% раствора NaOH и объем доводили до 10.0 мл этанолом. Содержимое колб оставляли на 10–20 мин, после чего проводили центрифугирование при 4000–6000 об/мин в течение 3–5 мин. После этого брали пустые мерные колбы объемом 10 мл и переносили в них 0.05 мл центрифугата обоих экстрактов (образца и контроля), а также раствора 3.0 мг/мл фруктозы (стандарт) и воды (контроль). На следующем этапе к полученному объему добавляли 1.0 мл реагента (2.0 мг/мл резорцина + 96% этанол и концентрированную соляную кислоту в равных объемах). Колбы выдерживали на водяной бане в течение 35 мин, а затем охлаждали. Объем доводили до 10 мл водой и перемешивали. Оптическую плотность анализируемых образцов и стандартного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-104 (Россия) при длине волны 480 нм. Содержание фруктозосодержащих сахаров в образцах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_{pr}C_{st} \times 10}{A_{st}m_{pr}},$$

где A_{pr} и A_{st} – оптическая плотность опытного образца и стандартного раствора соответственно; C_{st} – концентрация стандартного раствора фруктозы (3 мг/мл); m_{pr} – масса навески анализируемого образца каллуса, г. Результат, полученный для водного экстракта, отражает общее содержание водорастворимых углеводов. Результат для экстракта этанола отражает содержание низкомолекулярных фруктозидов. Разница между этими двумя показателями дает содержание инулина [38].

Определение сырой биомассы каллусных культур проводили в 5 биологических и 2 аналитических повторностях. Количественное определение инулина в каллусной ткани проводили в 2–3 биологических и 2 аналитических повторностях. Средние значения всех данных были рассчитаны с использованием Microsoft Excel 2013 (Microsoft, США). Дисперсионный анализ (ANOVA) проводили в программном обеспечении AGROS (версия 2.11, Россия) и сравнивали средние значения с использованием критерия наименьшей значимой разницы Фишера (LSD) при уровне значимости $P \le 0.05$. На диаграммах и в таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первым этапом работ было получение хорошо растущей стерильной культуры *C. intybus*. Применение в качестве стерилизующего агента $HgCl_2$ в концентрации 0.1% привело к получению 94.7% стерильных проростков. Семена *C. intybus* проращивали на безгормональной МС-среде в чашках Петри в условиях световой комнаты. Экспериментально установлено, что прорастание семян начиналось на 5 сут, а на 16 сут формировались полноценные проростки. Последующее культивирование на МС-среде, содержащей 1.0 мг/л БАП и 0.1 мг/л ИУК, в культуральных сосудах объемом 200 мл, приводило к появлению первых настоящих листьев, а в базальной части – адвентивных почек, которые в дальнейшем развивались в растения.

Из полученных растений изолировали настоящие листья, которые делили на сегменты 5 × 5 мм и культивировали на МС-среде с БАП (2 мг/л) в сочетании с различными ауксинами (ИУК, НУК, 2,4-Д в концентрации 5.5–9.5 мг/л). В результате проведенных исследований были установлены некоторые закономерности в образовании каллусной культуры цикория. Стоит отметить, что во всех вариантах исследуемых питательных сред пролиферация дедифференцированных клеток происходила на 3–7 сут с начала культивирования в местах среза и поранения листовой пластинки. Установлено, что существенное влияние на интенсивность образования каллусной ткани, ее структуру и цвет оказывали применяемые ауксины.

Культивирование листовых эксплантов на питательной среде, содержащей ИУК в различных концентрациях приводило к формированию каллусной ткани ярко-желтого цвета, средней плотности и с образованием меристематических очагов (рис. 2а). Причем начало каллусогенеза было отмечено уже на 3 сут с начала культивирования. При использовании НУК каллусная ткань имела плотную консистенцию и была белого или светло-желтого цвета (рис. 2б). Начало каллусогенеза отмечено на 5–7 сут. Иная картина наблюдалась при культивировании листовых эксплантов на среде, содержащей 2,4-Д. В этих условиях каллусная ткань формировалась бурого цвета и имела рыхлую консистенцию (рис. 1в). Следует отметить, что в этом варианте интенсивность каллусогенеза была минимальной и в процессе культивирования сформировавшаяся каллусная ткань погибала. Поэтому в дальнейших экспериментах питательные среды с содержанием 2,4-Д не использовали.

Изучение каллусной ткани на временных препаратах позволило установить, что ткань, полученная на питательной среде, содержащей ИУК, состояла из меристемоподобных и паренхимоподобных клеток округлой формы с крупной вакуолью (рис. 2д). В варианте с НУК каллусная ткань состояла из гетерогенных по форме и размеру паренхимоподобных клеток, как правило, вытянутой формы с крупной вакуолью (рис. 2г).

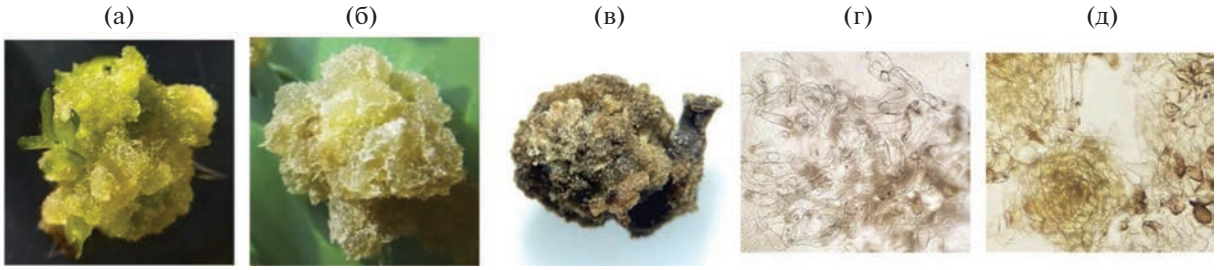


Рис. 2. Каллусная ткань *C. intybus* на МС-средах с ИУК (а, д), НУК (б, г), 2,4-Д (в).

Для характеристики каллусной ткани использовали такой показатель, как прирост, который оценивали на IV и V циклах выращивания. Определяли прирост каллусной ткани в зависимости от исследуемого ауксина и его концентрации (табл. 1).

Наибольший и стабильный прирост каллусной ткани отмечен при добавлении в состав питательной среды НУК в концентрации 8.5 мг/л. В этом варианте в IV и V циклах выращивания прирост каллусной ткани составил 6.28 и 5.96 соответственно, что превышает данный показатель в варианте с ИУК (8.5 мг/л) примерно в 2.0–2.4 раза. Однако следует отметить, что на МС-среде, содержащей НУК, пролиферативная активность дедифференцированных клеток уменьшалась с увеличением числа субкультивирований. Что касается варианта с ИУК, то независимо от числа пересадок и применяемых концентраций наблюдали стабильный прирост каллусных клеток. Кроме того, в этих вариантах в каллусной ткани в конце цикла культивирования было отмечено образование множественных меристематических очагов (рис. 3а), из которых в дальнейшем на безгормональной МС-среде формировались растения-регенеранты (рис. 3б). Следует отметить, что длительное выращивание растений-регенерантов на безгормональной МС-среде приводило к прохождению растениями всех фаз онтогенеза. Об этом свидетельствует образование на растениях цветочных почек с последующим их цветением (рис. 3в).

На основании проведенных исследований установлено, что оптимальной для формирования хорошо пролиферирующей каллусной культуры клеток оказалась МС-среда с 7.5 мг/л НУК или 7.5 мг/л ИУК в сочетании с 2.0 мг/л БАП. Данные варианты питательных сред были использованы в последующих экспериментах по изучению влияния спектрального состава света на морфо- и каллусогенез культуры клеток *C. intybus*.

Проведенные исследования позволили заключить, что для получения хорошо пролиферирующей, не морфогенной каллусной ткани необходимо присутствие в питательной среде НУК, а для получения растений-регенерантов из каллусной ткани – ИУК. Такие растения могут быть включены в селекционный процесс, направленный на отбор новых форм *C. intybus*.

Одним из регуляторных факторов морфо- и каллусогенеза является интенсивность и качество света. В работе было изучено влияние светодиодных ламп красного (R = 660 нм) и дальнего красного спектра (FR = 730 нм) и их соотношений на процесс формирования каллусной ткани, полученной из листовых сегментов микрорастений *C. intybus*. Во всех вариантах питательных сред применяли в качестве ауксина ИУК или НУК в концентрации 7.5 мг/л в сочетании с 2.0 мг/л БАП. Установлено, что световой режим выращивания оказывал влияние на интенсивность роста, структуру и цвет каллусной культуры. Так, при

Таблица 1. Влияние различных концентраций ауксинов на прирост каллусной ткани цикория на IV и V циклах выращивания

№ цикла выращивания	Ауксин	Концентрация ауксина, мг/л				
		5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
IV	ИУК	4.08 ± 0.21^{d}	2.92 ± 0.10^{b}	1.88 ± 0.91^{a}	3.16 ± 0.10^{bc}	4.08 ± 0.24^{d}
	НУК	4.12 ± 0.24^{d}	7.24 ± 0.31^{ef}	5.32 ± 0.31^{c}	6.28 ± 0.31^{def}	3.64 ± 0.12^{c}
V	ИУК	4.68 ± 0.28^{cde}	4.36 ± 0.23^{cd}	3.52 ± 0.11^{a}	2.96 ± 0.20^{ab}	4.64 ± 0.22^{cde}
	НУК	3.40 ± 0.11^{a}	4.20 ± 0.22^{c}	5.96 ± 0.28^{def}	5.96 ± 0.27^{def}	4.60 ± 0.24^{cde}

Примечание: Представлены средние арифметические значения (масса свежего каллуса, г) и их стандартные ошибки. В каждом цикле выращивания средние значения, за которыми следует другая латинская буква, значительно отличаются при альфа-уровне 0.05 в соответствии с тестом Фишера на наименьшую значимую разницу (LSD).

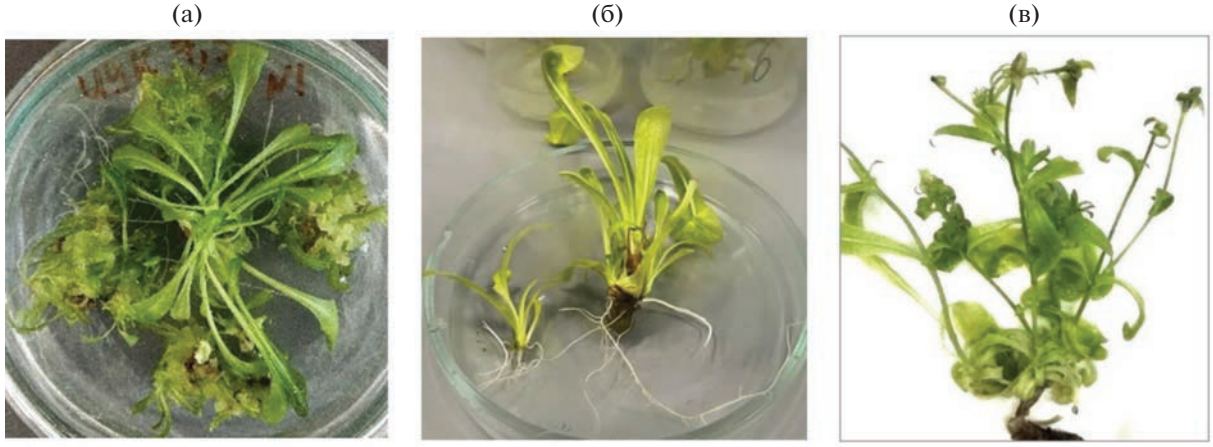


Рис. 3. Морфогенная каллусная ткань *C. intybus* на МС-среде с ИУК (а), растения-регенеранты (б) и их цветение *in vitro* на безгормональной МС-среде (в).

выращивании каллусной ткани в условиях светового режима FR > R на питательной среде, содержащей НУК, формировалась ткань рыхлого типа, состоящая из сильно вакуолизированных клеток, легко распадающаяся на отдельные клеточные агрегаты. Цвет каллусной ткани был желтым, а к центру появлялась антоциановая окраска (рис. 4а). В случае использовании питательной среды с ИУК формировалась каллусная ткань зеленого цвета, плотного типа, с образованием множества меристематических очагов по всей поверхности ткани (рис. 4б).

При выращивании каллусной ткани в условиях светового режима FR = R на питательной среде, содержащей НУК, формировалась ткань рыхлого типа, слабо оводненная, легко распадающаяся на отдельные клеточные агрегаты. Цвет каллусной ткани был светло-желтым или белым без антоциановых участков (рис. 4в). В случае использовании питательной среды с ИУК формировалась каллусная ткань светло-зеленого цвета с антоциановой окраской, плотного типа, с образованием множества меристематических очагов по всей поверхности ткани (рис. 4г). Однако сформировавшиеся адвентивные побеги имели ланцетовидную листовую пластинку, что не характерно для растений с нормальной морфологией.

При выращивании каллусной ткани в условиях светового режима FR < R на питательной среде, содержащей НУК, формировалась ткань рыхлого типа, слабо оводненная, легко распадающаяся на отдельные клеточные агрегаты. Цвет каллусной ткани был светло-желтым или белым без антоциановых участков (рис. 4д). В случае использовании питательной среды с ИУК формировалась каллусная ткань ярко-зеленого цвета с антоциановой окраской, средней плотности, с образованием множества меристематических очагов по всей поверхности ткани (рис. 4е). Однако сформировавшиеся адвентивные побеги были витрифицированные, что не позволило в дальнейшем получить из них растения-регенеранты.

На втором этапе работы необходимо было изучить влияние гормонального состава питательной среды и светокультуры на накопление инулина в каллусной культуре клеток *C. intybus*. Установлено, что выращивание каллусной ткани в условиях освещения белыми линейно-люминесцентными лампами на МС-среде, содержащей ИУК в концентрации 7.5 мг/л в сочетании с БАП 2.0 мг/л приводило к накоплению инулина в каллусной ткани в 5 раз больше, по сравнению с вариантом питательной среды, в которой присутствовал НУК 7.5 мг/л (рис. 5). Такое соотношение было характерно для IV и V циклов культивирования. Повышенное содержание инулина в каллусе, полученном на агаризованной МС-среде с добавлением ИУК, можно объяснить появлением меристематических очагов. В варианте с НУК формировалась неморфогенная каллусная ткань.

Изучение влияния спектрального состава света на накопление инулина в каллусных клетках цикория выявило четкую зависимость накопления инулина от качества света. Установлено, что увеличение PPFD в среднем на 100 мкмоль/м^2 с во всех вариантах светокультуры (PPFD = 142 $\pm$ $\pm$ 10 мкмоль/м^2 с) приводило к увеличению накопления инулина в среднем на 28% по сравнению с контрольным вариантом (белые линейно-люминесцентные лампы, PPFD = 40 мкмоль/м^2 с). Наибольшую чувствительность к изменению спектрального состава света проявляла каллусная ткань, культивируемая на МС-среде в сочетании с ИУК. Наибольшее количество инулина 7.5–8.0% в сухой биомассе клеток в каллусной ткани было получено при выращивании в условиях FR > R, что превышает контрольный вариант в среднем

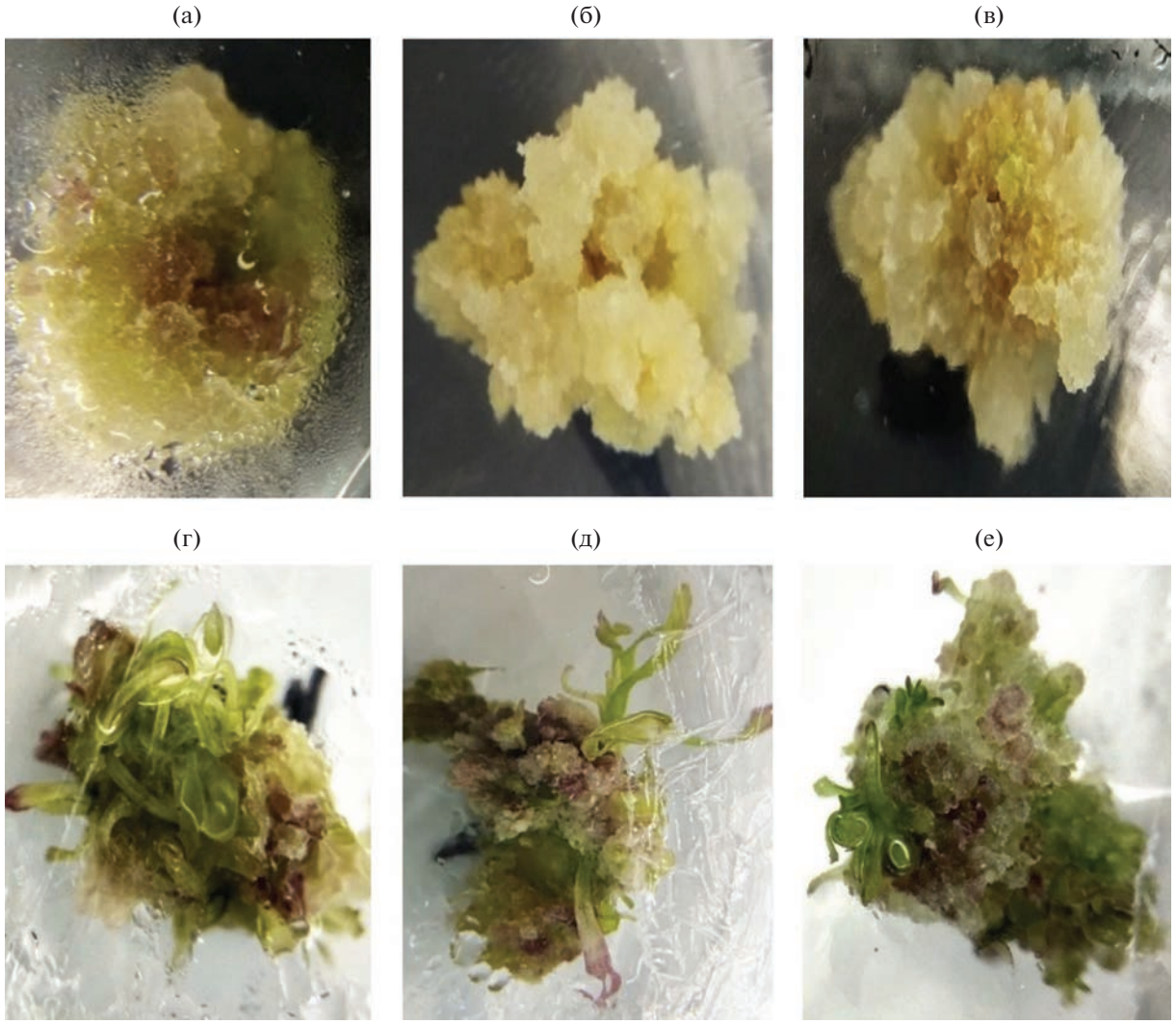


Рис. 4. Каллусная ткань *C. intybus*, полученная при культивировании на МС-среде с добавлением 2.0 мг/л БАП в сочетании с: (а) – режим FR > R, 7.5 мг/л НУК; (б) – режим FR = R, 7.5 мг/л НУК; (в) – режим FR < R, 7.5 мг/л НУК; (г) – режим FR > R, 7.5 мг/л ИУК; (д) –режим FR = R, 7.5 мг/л ИУК; (е) – режим FR < R, 7.5 мг/л ИУК.

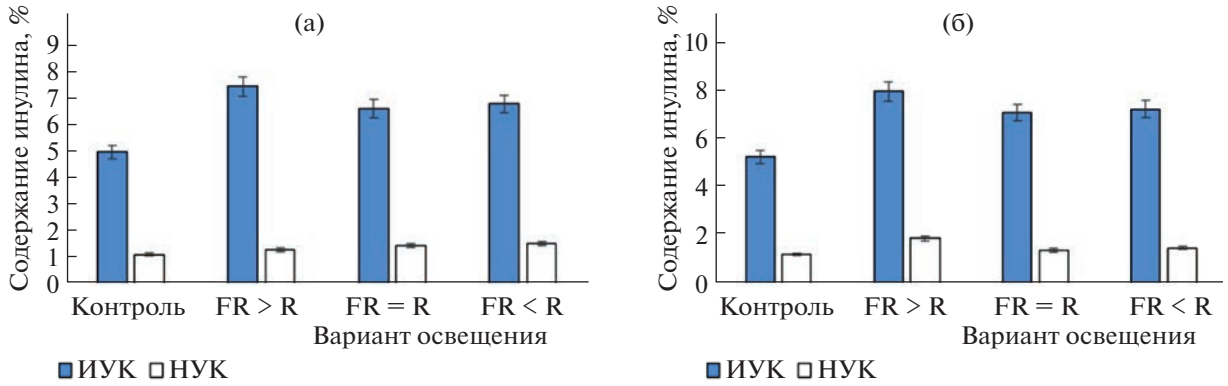


Рис. 5. Влияние светокультуры (FR > R, FR = R, FR < R) и регуляторов роста растений (2.0 мг/л БАП в сочетании с 7.5 мг/л НУК) на содержание инулина в каллусе цикория при: (а) – IV цикле выращивания; (б) – V цикле выращивания. Средние значения (процент содержания инсулина), за которыми следует другая латинская буква, значительно отличаются при альфа-уровне 0.05 в соответствии с тестом Фишера на наименьшую значимую разницу (LSD). Для каждой процедуры $n = 150$.

на 33–50%. Количество инулина в каллусной ткани в вариантах FR = R и FR < R не отличалось и составило 6.7–6.9%. Такая закономерность была отмечена на IV и V циклах выращивания (рис. 5).

Выращивание каллусной культуры клеток на МС-среде дополненной 7.5 мг/л НУК в сочетании с 2.0 мг/л БАП и в условиях светокультуры, оказало несущественное влияние на содержание инулина в клетках. Содержание инулина увеличилось в среднем на 16–38% по сравнению с контрольным вариантом. На IV цикле выращивания наибольшее количество инулина было отмечено в варианте FR < R и превышало контроль в среднем на 38%. В остальных вариантах освещения учитываемый показатель был на уровне контроля (рис. 5а). Значительная разница в содержании инулина в каллусных культурах была отмечена на V цикле выращивания в варианте FR > R (рис. 5б). В этом варианте содержание инулина превышало контрольный вариант в среднем на 40%. В остальных вариантах (FR = R, FR < R) существенных различий не обнаружено.

Таким образом, высокая способность каллусных клеток синтезировать и накапливать инулин обусловлена гормональным составом питательной среды и условиями их выращивания. Установлено, что взаимодействие двух факторов – присутствие в составе питательной среды ИУК и спектральный состав света (FR > R, FR = R, FR < R) оказало существенное влияние на биосинтетический потенциал клеточных культур. Вероятно, высокое содержание инулина в каллусных культурах обусловлено тем, что именно в этих условиях формировалась хорошо пролиферирующая и высокоморфогенная каллусная ткань.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее перспективным направлением для развития пищевой промышленности является производство функциональных и диетических продуктов питания. К таким продуктам относятся продукты, содержащие пищевые волокна, антиоксиданты, пребиотики и т.д. Одним из эффективных пребиотиков является инулин, который содержится в цикории, что определяет важность этой культуры для пищевой и фармацевтической промышленности.

Использование методов биотехнологии не только позволяет размножать и получать высококачественный посадочный материал, но и создавать *in vitro* культуры клеток лекарственных растений с повышенным содержанием биологически активных веществ [26]. Биосинтетический потенциал культивируемых клеток зависит от минерального состава питательной среды, а также факторов физической (интенсивность света, спектральный состав света) и химической (экзогенное содержание гормонов в питательной среде) природы. Изменение каждого из этих факторов может привести к регуляции биосинтетического потенциала культивируемых клеток *in vitro* [36].

Большинство данных указывает на то, что оптимальным эксплантом для получения каллусной культуры клеток и растений-регенерантов цикория являются листовые эксплантаты, а наилучшие гормоны – это сочетание БАП с ИУК или НУК в разных концентрациях [29–31, 33]. Результаты наших исследований подтверждают данные других авторов. Следует отметить, что оптимальными условиями для индукции морфо- и каллусогенеза было присутствие в МС-среде ИУК или НУК концентрации 7.5 мг/л в сочетании с БАП 2.0 мг/л. Применение 2,4-Д ни в одном из исследуемых вариантов не приводило к образованию хорошо пролиферирующей каллусной ткани. Известно, что морфогенетический потенциал культивируемых клеток *in vitro* зависит от применяемого гормона, его природы и концентрации. Нами показано, что использование ИУК или НУК приводило к формированию морфогенной и неморфогенной каллусной ткани соответственно. Кроме того, нами установлены различия по влиянию изученных ауксинов на содержание инулина в каллусных культурах. Связь биосинтетического потенциала с дифференцировкой дедифференцированных клеток подчеркнуто результатами целого ряда исследований, проведенных с различными видами культур *in vitro*. Наши исследования показали, что на среде с ИУК количество инулина в каллусной ткани больше, по сравнению с вариантом среды с НУК. Аналогичные результаты были получены и другими авторами [39]. В нашем случае можно предположить, что высокое содержание инулина в каллусе на МС-среде с ИУК обусловлено образованием меристематических очагов по всей поверхности каллуса. По мнению ряда авторов именно в дифференцированных клетках синтезируется биологически активные вещества больше, чем в дедифференцированных клетках [32, 33, 36, 39].

Хорошо известно, что важным фактором, оказывающим влияние на рост, развитие и продуктивность растений, является интенсивность и спектральный состав света. В условиях недостаточного поступления солнечного света нарушается процесс фотосинтеза, а также снижаются продуктивность и устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды [40]. В литературе имеются многочисленные работы, посвященные изучению влияния спектрального состава света и его интенсивности на морфофизиологические процессы растений *in vitro* и *in vivo* [27, 28, 30, 32, 36]. В своих исследованиях Shulgina с соавт. показали, что выращивание клеточных культур в условиях светокультуры, с использованием красного света, приводит к интенсивному росту побегов и корней

микрорастений *in vitro*, по сравнению с культивированием их в условиях белого и синего света [36]. Кроме того, показано, что красный свет усиливает синтез углеводов в листьях, в то время как синий свет усиливает синтез белков [36]. Наши исследования показали, что использование различных условий освещения (FR > R, FR = R, FR < R) оказывает значительное стимулирующее действие на накопление инулина в каллусе. Более того, максимальное значение инулина (7.5–8.0% к сухой биомассе клеток) было получено в морфогенной каллусной ткани, культивируемой на МС-среде, содержащей 7.5 мг/л ИУК в сочетании с 2.0 мг/л БАП при режиме освещения FR > R. В случае использования питательной среды с НУК (7.5 мг/л) наилучшие результаты по содержанию инулина в дедифференцированных клетках было так же получено в варианте освещения FR > R.

Результаты исследования подтверждают выдвинутую разными авторами гипотезу о специфичности культивируемых клеток *in vitro* синтезировать и накапливать вторичные метаболиты в дедифференцирумых клетках, и зависимости этого процесса от факторов химической и физической природы. Однако механизмы, лежащие в основе закономерностей синтеза и накопления инулина в клеточных культурах *C. intybus*, требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена в рамках тематического плана-задания на выполнение научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО “Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева” по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета в 2023 году.

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. *McClelland J.W., Allen J.C., Zakir S.* Bio-medicinal effect of sweet potato in people with diabetes // J. Am. Diet. Assoc. 2007. V. 8. A104. https://doi.org/10.1016/j.jada.2007.05.396
2. *Ikanone C.E.O., Oyekan P.O.* Effect of boiling and frying on the total carbohydrate, vitamin C and mineral contents of Irish (*Solanun tuberosum*) and Sweet (*Ipomea batatas*) potato tubers // Niger. Food J. 2014. V. 32. P. 33. https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30115-6
3. *Mohammad K.A.* A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam): revisiting the associated health benefits // Trends Food Sci. Technol. 2021. V. 115. P. 512. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.001
4. *World Health Organization*. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. World Health Organization. 2013.
5. *Tutelyan V.A., Sukhanov B.P., Kochetkova A.A., Shevel-eva S.A., Smirnova E.A.* Russian regulations on nutraceuticals, functional foods, and foods for special dietary uses // Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world / Ed. D. Bagchi. Academic Press. 2019. P. 399. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816467-9.00026-5
6. *Roberfroid M.* Inulin-type fructans: functional food ingredients // J. Nutr. 2007. V. 137. 2493S-2502S. https://doi.org/10.1201/9780203504932
7. *Barclay T., Ginic-Markovic M., Cooper P., Petrovsky N.* Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses // J. Excip. Food Chem. 2016. V. 1. P. 1132.
8. *Kathy R.N.* Inulin and oligofructose: what are they? // J. Nutr. 1999. V. 129. 1402S-1406S. https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1402S
9. *Kalyani N.K., Kharb S., Thompkinson D.K.* Inulin dietary fiber with functional and health attributes – a review // Food Rev. Int. 2010. V. 26. P. 189. 10.1080/87559121003590664
10. *Boeckner L.S., Marilynn I.S., Bryan C.T.* Inulin: a review of nutritional and health implications // Adv. Food Nutr. Res. 2001. V. 43. P. 1. https://doi/org/ https://doi.org/10.1016/S1043-4526(01)43002-6
11. *Bais H.P., Ravishankar G.A. Cichorium intybus* L. cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects // J. Sci. Food Agric. 2001. V. 81. P. 467. https://doi.org/10.1002/jsfa.817
12. *Abbas Z.K., Saggu S., Sakeran M.I., Zidan N., Rehman H., Ansari A.A.* Phytochemical, antioxidant and mineral composition of hydroalcoholic extract of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves // Saudi J. Biol. Sci. 2015. V. 22. P. 322. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.015
13. *Molan A.L., Duncan A.J., Barry T.N., McNabb W.C.* Effect of condensed tannins and sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes // Parasitol. Int. 2003. V. 52. P. 209. https://doi.org/10.1016/S1383-5769(03)00011-4
14. *Nandagopal S., Ranjitha B.D.* Phytochemical and antibacterial studies of chicory (*Cichorium intybus* L.) – a multipurpose medicinal plant // Adv. Biol. Res. 2007. V. 1. P. 17. https://doi.org/10.1016/S1383-5769(03)00011-4
15. *Muthusamy V.S., Anand S., Sangeetha K.N., Sujatha S., Arun B., Lakshmi B.S.* Tannins present in *Cichorium intybus* enhance glucose uptake and inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition // Chem.-Biol. Interact. 2008. 174 (1). P. 69. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.016
16. *Atta A.H., Elkoly T.A., Mouneir S.M., Kamel G., Alwabel N.A., Zaher S.* Hepatoprotective effect of methanolic extracts of *Zingiber officinale* and *Cichorium intybus* // Indian J. Pharm. Sci. 2010. V. 72. P. 564. https://doi.org/10.4103/0250-474X.78521
17. *Meehye K., Shin H.K.* The water-soluble extract of chicory reduces glucose uptake from the perfused jejunum in rats // J. Nutr. 1996. V. 126. P. 2236. https://doi.org/10.1093/jn/126.9.2236

18. *Afzal S., Afza N., Awan M.R., Khan T.S., Gilani A., Khanum R., Tariq S.* Ethno-botanical studies from Northern Pakistan // J. Ayub. Med. Coll. Abbotabad. 2009. V. 21. P. 52.

19. *Abbasi A.M., Khan M.A., Ahmad M., Zafar M., Khan H., Muhammad N., Sultana S.* Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation // Afr. J. Biotechnol. 2009. V. 8. P. 1643.

20. *Jamshidzadeha A., Khoshnood M.J., Dehghani Z., Niknahad H.* Hepatoprotective activity of Cichorium intybus L. leaves extract against carbon tetrachloride induced toxicity // Iran. J. Pharm. Res. 2006. V. 1. P. 41. https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.651

21. *Hassan H.A.* The prophylactic role of some edible wild plants against nitrosamine precursor's experimentally-induced testicular toxicity in male albino rats // J. Egypt. Soc. Toxicol. 2008. V. 38. P. 1.

22. *Nayeemunnisa A.* Alloxan diabetes-induced oxidative stress and impairment of oxidative defense system in rat brain: neuroprotective effects of *Cichorium intybus* L. // Int. J. Diabetes Metabol. 2009. V. 17. P. 105. https://doi.org/10.1159/000497681

23. *Mulabagal V., Wang H., Ngouajio M., Nair M.G.* Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (*Cichorium intybus*) varieties // Eur. Food Res. Technol. 2009. V. 230. P. 47. https://doi.org/10.1007/s00217-009-1144-7

24. *Hassan H.A., Yousef M.I.* Ameliorating effect of chicory (*Cichorium intybus* L.) -supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats // Food Chem. Toxicol. 2010. V. 48. P. 2163. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.023

25. *Taylor R.L.* Weeds of Roadsides and Waste Ground in New Zealand. The Caxton Press: Christchurch, New Zealand. 1981. P. 177.

26. *Parsons J.L., Cameron S.I., Harris C.S., Smith M.L.* Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations // Pharm. Biol. 2018. V. 56. P. 485. https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1501583

27. *Toponi M.* Action combining kinetin and acid Indole acetic on the neoformation of organs by fragments of leaves of endive (*Cichorium intybus* L) grown *in vitro* // C.R. Acad. Sci. Paris. 1963. V. 257. P. 3030.

28. *Park E., Lim H.* Establishment of an efficient *in vitro* plant regeneration system in Chicory (*Cichorium intybus* L) // Acta Hortic. 1999. V. 483. P. 367. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.483.42

29. *Velayutham P., Kumari B.D., Baskaran P.* An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L. – an important medicinal plant // J. Agric. Technol. 2006. V. 2. P. 287.

30. *Rehman R.U., Israr M., Srivastava P.S., Bansal K.C., Abdin M.Z. In vitro* regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and accumulation of esculin // In Vitro Cell Dev. Biol. 2003. V. 39. P. 142. https://doi.org/10.1079/IVP2002381

31. *Yucesan B., Turker A.U., Gurel E.* TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2007. V. 91. P. 243. https://doi.org/10.1007/s11240-007-9290-8

32. *Ohadi Rafsanjani S.M., Alvari A., Mohammad A.Z., Abdin M., A Hejazi M. In vitro* propagation of *Cichorium intybus* L. and quantification of enhanced secondary metabolite (esculin) // Recent Pat. Biotechnol. 2011. V. 5. P. 227. https://doi.org/10.2174/187220811797579123

33. *Dakshayini K., Rao C.V., Karun A., Bhavyashree U., Ujwal P.* High-frequency plant regeneration and histological analysis of callus in *Cichorium intybus*: an important medicinal plant // J. Phytol. 2016. V. 8. P. 7. https://doi.org/10.19071/jp.2016.v8.2980

34. *Wagner G.M., Eneva T.* Positive effect of cefotaxime on plant regeneration from *Cichorium intybus* L. leaf material // Landbauforschung Voelkenrode. 1996. V. 46. P. 166.

35. *Cadalen T., Morchen M., Blassiau C.* Development of SSR markers and construction of a consensus genetic map for chicory (*Cichorium intybus* L). // Mol. Breed. 2010. V. 25. P. 699. https://doi.org/10.1007/s11032-009-9369-5

36. *Shulgina A.A., Kalashnikova E.A., Tarakanov I.G., Kirakosyan R.N., Cherednichenko M.Y., Polivanova O.B., Baranova E.N., Khaliluev M.R.* Influence of light conditions and medium composition on morphophysiological characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* and *in vivo* // Horticulturae. 2021. V. 7. P. 195. https://doi.org/10.3390/horticulturae7070195

37. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

38. *Касьян И.Г., Касьян А.К.* Оптимизация спектрофотометрического способа определения инулина в клубнях топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) // Седьмая Международная научно-практическая конференция Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям. Кишинев, 2019. С. 121.

39. *Rnjitha Kumari B.D., Velautham P., Anitha S.* A comparative study on inulin and esculin content of *in vitro* and *in vivo* plants of chicory (*Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow local) // Adv. Biol. Res. 2007. V. 1. P. 22.

40. *Velayutham P., Ranjitha Kumari B.D.* Influence of photoperiod on *in vitro* flowering in *Cichorium intybus* L. // Indian J. Plant Physiol. 2003. V. 218. P. 90.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 402–409

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

КРАТКОВРЕМЕННЫЕ ЕЖЕСУТОЧНЫЕ ПОНИЖЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ МОГУТ НИВЕЛИРОВАТЬ НЕГАТИВНЫЙ ЭФФЕКТ КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ РАСТЕНИЙ

© 2023 г. Е. Н. Икконен[a], *, Т. Г. Шибаева[a], Е. Г. Шерудило[a], А. Ф. Титов[a]

[a] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, Россия*

**e-mail: likkonen@gmail.com*

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.
После доработки 14.02.2023 г.
Принята к публикации 14.02.2023 г.

Изучали реакцию нескольких сельскохозяйственных культур (томат, баклажан, сладкий перец, огурец) на круглосуточное освещение при постоянной температуре 26°C и при ежесуточных 2-часовых кратковременных понижениях температуры до 10°C (дроп-воздействиях). О реакции растений судили на основании изучения ряда показателей, характеризующих состояние пигментного комплекса листьев и их фотосинтетическую активность. Круглосуточное освещение при постоянной температуре приводило к фотоповреждению листьев и фотоингибированию у всех четырех видов, хотя и в разной степени. Дроп-воздействия предотвращали фотоповреждения листьев в условиях круглосуточного освещения у всех видов и способствовали у томата, перца и огурца сохранению высокого уровня фотосинтетической активности. Полученные результаты позволяют заключить, что дроп-обработка может рассматриваться как агротехнический прием, позволяющий использовать потенциальные преимущества применения круглосуточного освещения, нивелировав его отрицательные эффекты. Однако эффективность данного приема будет зависеть от подбора оптимальной интенсивности и продолжительности дроп-воздействия, которая может несколько варьировать в зависимости от вида растений.

Ключевые слова: *Capsicum annuum*, *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum melongena*, фотоингибирование, фотопериод, фотоповреждения, фотосинтез

DOI: 10.31857/S0015330323600092, **EDN:** QAVQOK

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы интерес исследователей к влиянию круглосуточного освещения (CL, от *continuous lighting*) на растения заметно усилился в связи с его применением при выращивании растений в условиях защищенного грунта и на фабриках с искусственным освещением (plant factories with artificial lighting, PFAL) [1–8]. CL с относительно низкой плотностью потока фотонов рассматривается как один из возможных способов снижения первоначальных и операционных затрат на освещение и охлаждение [9–12]. Теоретически CL может способствовать увеличению продуктивности растений, так как в этом случае обеспечивается постоянное поступление световой энергии для фотосинтеза. Однако реализовать эти преимущества на практике удается не всегда. Свет, будучи по своей природе агрессивным фактором в отношении живых организмов, в условиях длинных фотопериодов приводит к негативным изменениям в пигментном комплексе растений и к повреждениям, проявляющимся в виде хлороза и некроза листьев, у таких чувствительных к свету культур как томат, баклажан, огурец, картофель и др. [1–3, 8, 12–22]. В условиях CL у этих видов ингибируется фотосинтез, происходит накопление углеводов и ускоряется старение листьев. В то же время растения арктической зоны, испытывающие в условиях полярного дня длительное действие CL, не проявляют признаков фотоингибирования или фотоповреждения листьев. Предположительно это связано с тем, что в теплицах и в закрытых системах поддерживается относительно постоянная температура, тогда как в естественных условиях температура в суточном цикле, как правило, колеблется, что задает ритм вместо светового фактора [2] и, вероятно, способствует тем самым снижению неблагоприятного воздействия CL.

Ранее было показано, что в контролируемых условиях чередование температур в суточном цик-

ле может предотвращать физиологические нарушения у культурных растений, вызванные CL [13, 16, 18, 20, 22–24]. Так, еще в 1930-х годах было установлено, что суточный градиент температур (день/ночь) 30/10°C значительно уменьшает повреждение листьев томатов при CL [25], хотя не все суточные градиенты температур могут быть в этом плане одинаково эффективны. Например, градиент температур 26/17°C уменьшал повреждение листьев томата, а градиент температур 26/20°C не оказывал существенного влияния [13]. Листья растений картофеля в условиях CL и постоянной температуры воздуха (18°C) были в значительной степени подвержены хлорозу, а при переменной температуре (22/14°C) они имели обычный вид и не были повреждены [22]. При этом у растений увеличивалось количество побегов, сухая масса надземных органов, длина листьев, а также отмечено более раннее появление клубней. Хлороз листьев не наблюдался также у растений сладкого перца, выращенных в камерах искусственного климата при CL и переменных температурах (с градиентом в течение суток в 8–10°C) [24]. Было высказано предположение, что переменная температура при CL оптимизирует углеродный баланс и тем самым снижает вероятность повреждения листьев [16]. В опытах с баклажаном было установлено, что при CL и температурном режиме 28/15°C листья растений не повреждаются и не происходит гипераккумуляции углеводов (крахмала, сахарозы, глюкозы и фруктозы) по сравнению с растениями, выращенными при режимах 25/25°C и 25/20°C [16]. По мнению авторов, этот результат связан с прямым ингибированием низкой температурой ассимиляции CO_2 или с активизацией метаболизма и оттока сахаров при градиентном температурном режиме.

Как показано в наших исследованиях на томате, не только термопериод, но и кратковременные ежесуточные понижения температуры (дроп-воздействия, от англ. *drop* – падение, снижение) до закаливающих значений могут препятствовать фотоповреждению листьев и оптимизировать работу фотосинтетического аппарата [26–28]. Поэтому, применительно к томату, дроп-обработка может рассматриваться как агротехнический прием, позволяющий использовать потенциальные преимущества применения CL, нивелировав его отрицательные эффекты. Однако данный вывод касался только томата и не ясно, можно ли его экстраполировать на другие виды и придать ему более широкий характер и фундаментальное значение. С целью проверки такой возможности нами были проведены соответствующие исследования с несколькими видами сельскохозяйственных растений – томатом, баклажаном, сладким перцем и огурцом, различающимися по своей чувствительности к CL.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пророщенные семена томата (*Solanum lycopersicum* L.), баклажана (*Solanum melongena* L.), сладкого перца (*Capsicum annuum* L.) и огурца (*Cucumis sativus* L.) высаживали по одному в пластиковые сосуды объемом 350 мл с песком. В течение 8 суток после посадки растения выращивали в камерах искусственного климата при температуре 26°C, 150 мкмоль/(м^2 с) ФАР, влажности воздуха 60% и 16-часовом фотопериоде при ежедневном поливе полным питательным раствором Хогланда (pH 6.2–6.4). Далее все растения каждого вида были разделены на три равные группы. Первую группу растений выращивали при 16-часовом фотопериоде и постоянной температуре 26°C (вариант 16ФП), вторую – при 24-часовом фотопериоде и постоянной температуре 26°C (вариант 24ФП), а третью группу растений выращивали при 24-часовом фотопериоде, температуре 26°C в течение 22 ч и температуре 10°C в течение 2 ч в конце 24-часового цикла (вариант 24ФП+дроп). Условия полива, уровня освещенности и влажности воздуха сохраняли первоначальными для всех опытных вариантов. Растения томата выращивали в течение 32 дней от замачивания семян, баклажана – 50 дней, сладкого перца – 53 дней, огурца – 14 дней.

Измерения параметров флуоресценции хлорофилла, скорости нетто-ассимиляции CO_2 (A_n), устьичной проводимости (g_s) и содержания CO_2 в межклеточном (C_i) и окружающем пространстве (C_a) проводили на самом молодом из зрелых листьев в конце опыта. Флуоресценцию хлорофилла определяли с использованием флуориметра с импульсно-модулированным освещением MINI-PAM (Walz, Германия). Потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (F_v/F_m) определяли после 20-минутной темновой адаптации листьев, а реальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (φ_{II}) определяли после 30-минутной световой адаптации листьев и рассчитывали как $\varphi_{II} = \Delta F/F'_m = (F'_m - F)/F'_m$).

Параметры CO_2- и H_2O-обмена листьев измеряли с использованием портативной фотосинтетической системы HCM-1000 (Walz, Германия) при температуре листа 26°C, 1000 мкмоль/(м^2 с) ФАР, 60–65% влажности воздуха и содержании CO_2, равном 400 ± 20 ppm. Измерения выполняли после полной стабилизации процессов газообмена.

Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилла (Хл) *a* и *b*, каротиноидов (Кар)) определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия), экстрагируя их 96% этиловым спиртом и рассчитывая по известным формулам [29]. Долю хлорофиллов светособирающего комплекса (Хл ССК) устанавливали исходя из того, что весь Хл *b* находится в ССК, а соотношение Хл *a*/*b* при этом составляет 1.2 [30].

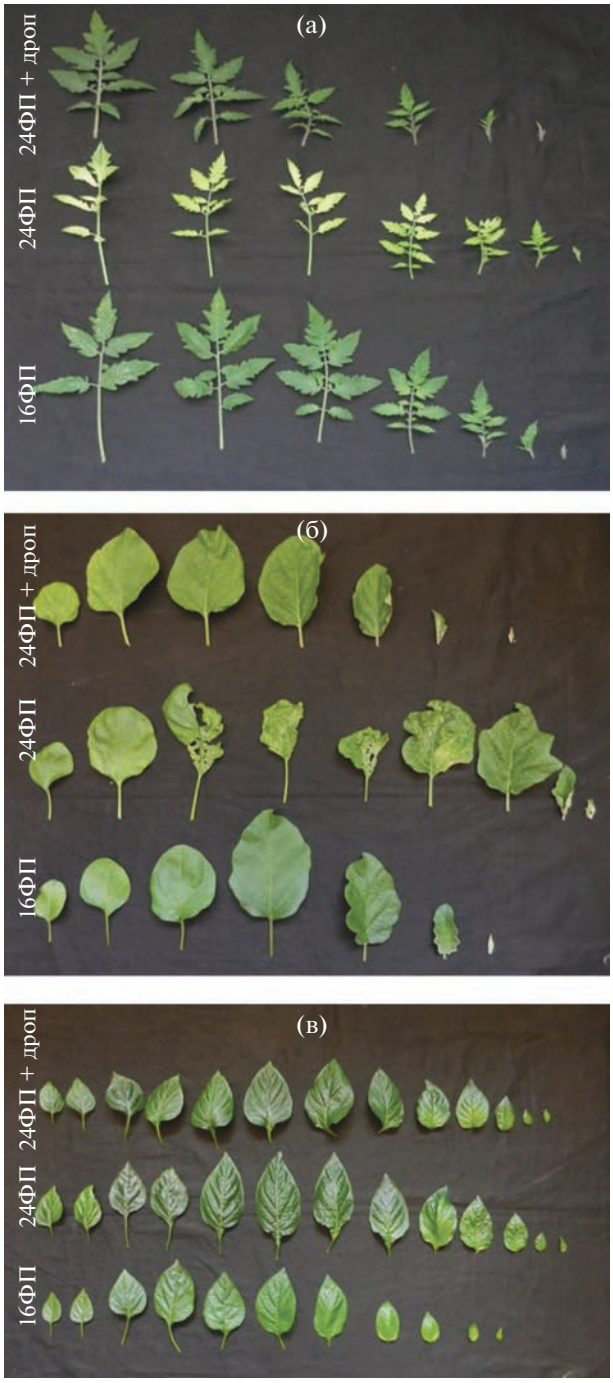


Рис. 1. Внешний вид листьев растений томата (а), баклажана (б) и сладкого перца (в), выращенных в условиях 16-часового фотопериода (16ФП), 24-часового фотопериода и постоянной температуры (24ФП) и 24-часового фотопериода с дроп-воздействиями (24ФР+дроп).

Сухую массу побегов определяли после высушивания при 105°С до постоянного веса. Перед высушиванием листья сканировали для определения их площади с помощью программы “AreaS”. Значение LMA (от англ. *leaf mass per area*) рассчитывали, как отношение сухой массы листовой пластинки к ее площади.

В работе представлены средние значения из четырех и более повторностей и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями определяли при $P < 0.05$ на основе дисперсионного анализа (LSD тест) с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все растения, выращенные при 16-часовом фотопериоде и температуре 26°С, имели обычный вид, хорошо развитые побеги, листовой аппарат и пигментный комплекс. В условиях варианта 24ФП у растений томата и огурца были зафиксированы повреждения листьев, которые проявлялись в виде межжилкового хлороза (рис. 1а). У баклажана, кроме хлороза, развивался некроз (рис. 1б). Листья сладкого перца имели темно-зеленую окраску, однако были морщинистыми и с симптомами оэдемы (отек зеленой части растения, свидетельствующей об осмотическом стрессе) (рис. 1в). У растений в варианте 24ФП+дроп явных признаков фотоповреждений не наблюдалось, однако листья томата и баклажана были немного светлее, чем в варианте 16ФП и в период активного роста листа наблюдалась небольшая пятнистость (рис. 1).

По сравнению с вариантом 16ФП в варианте 24ФП сухая масса побегов была значительно ниже у томата, выше у баклажана и сладкого перца и не менялась у огурца (рис. 2а). Аналогичная ситуация наблюдалась и в отношении площади листьев томата, баклажана и сладкого перца (рис. 2б). У огурца площадь листьев также была меньше в варианте 24ФП по сравнению с 16ФП. Круглосуточное освещение снижало значения LMA у томата и баклажана и повышало у сладкого перца и огурца относительно варианта 16ФП (рис. 2в). Дроп-воздействия в условиях 24-часового фотопериода приводили к значительному увеличению сухой массы побега и площади листьев у томата, снижению этих показателей у баклажана и не сказывались на них у сладкого перца и огурца (рис. 2а, б). У томата и сладкого перца величина LMA была существенно выше в варианте 24ФП + + дроп, чем в других вариантах опыта (рис. 2в).

Существенное снижение содержания Хл *a* и *b* в варианте 24ФП по сравнению с вариантом 16ФП было характерно для томата и огурца (табл. 1). У сладкого перца содержание Хл не различалось достоверно между вариантами 24ФП и 24ФП + дроп, но было выше, чем в варианте 16ФП. Соотношение Хл *a*/*b* не различалось достоверно между всеми опытными вариантами у баклажана и огурца, но у томата и перца было существенно выше в варианте 24ФП, чем в других вариантах. В условиях CL

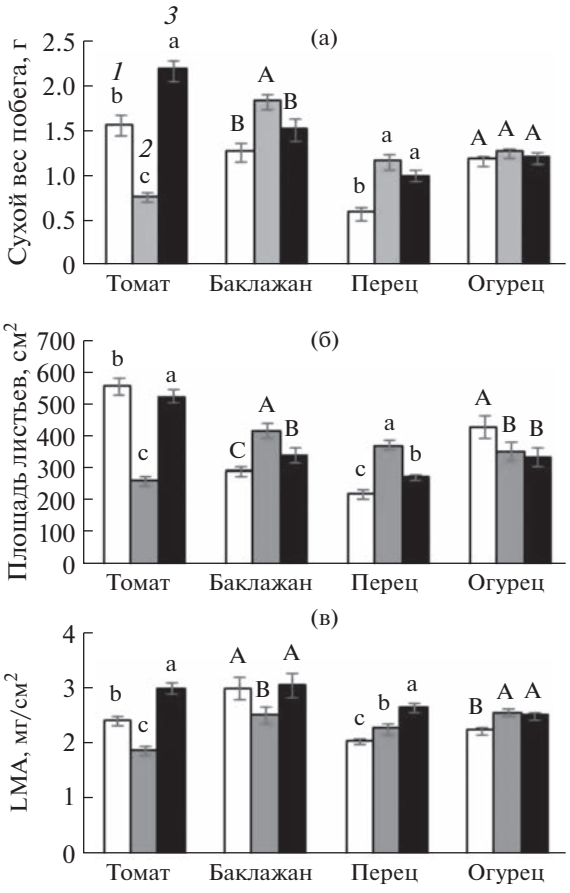


Рис. 2. Сухая биомасса побегов (а), площадь листьев (б), отношение массы листовой пластинки к ее площади (в) у растений томата, баклажана, сладкого перца и огурца, выращенных в условиях 16-часового фотопериода (*1*), 24-часового фотопериода и постоянной температуры (*2*) и 24-часового фотопериода с дроп-воздействиями (*3*). Различные буквы указывают на достоверность различий средних значений при $P < 0.05$.

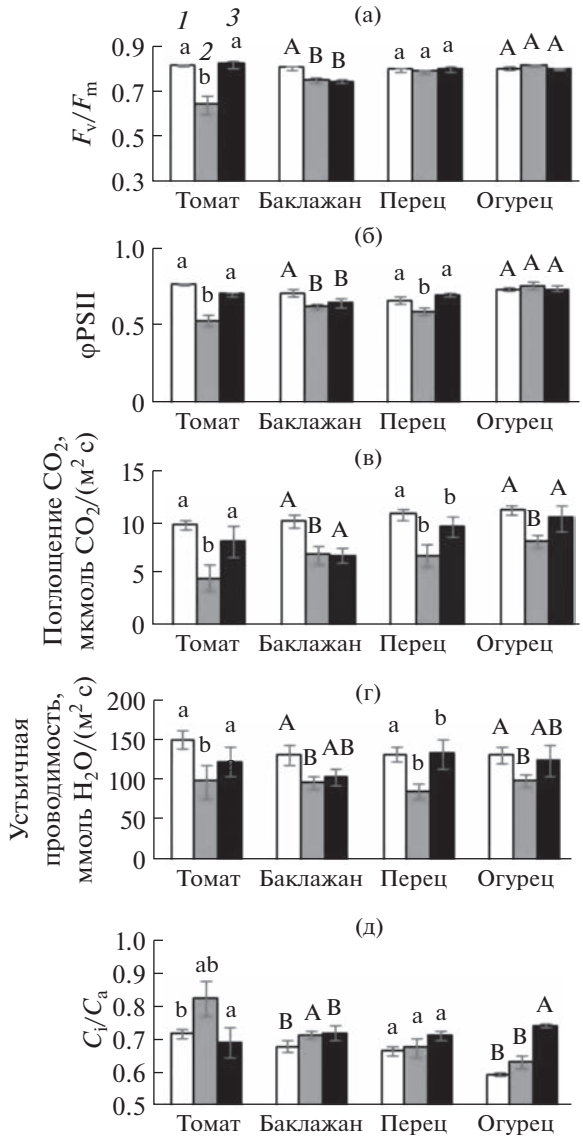


Рис. 3. Потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (F_v/F_m) (а), реальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (φ_{II}) (б), скорость видимого фотосинтеза (в), устьичная проводимость (г), отношение содержания CO_2 в межклеточном (C_i) и окружающем (C_a) пространстве (д) у растений томата, баклажана, сладкого перца и огурца, выращенных в условиях 16-часового фотопериода (*1*), 24-часового фотопериода и постоянной температуры (*2*) и 24-часового фотопериода с дроп-воздействиями (*3*). Различные буквы указывают на достоверность различий средних значений при $P < 0.05$.

дроп-воздействия вызывали увеличение содержания Хл у томата и огурца и снижали соотношение Хл *a*/*b* у томата и перца. Не выявлено существенных различий между вариантами в содержании Кар у огурца, томата и баклажана, а у перца оно было наибольшим в варианте 24ФП. В отличие от баклажана и огурца, перец и томат реагировали на CL уменьшением соотношения Хл и Кар, при этом дроп-воздействия существенно его повышали. Уменьшение содержания Хл ССК в варианте 24ФП по сравнению с 16ФП отмечено только у томата, но в варианте 24ФП + дроп этого не происходило.

Величина F_v/F_m была существенно ниже в варианте 24ФП, чем в варианте 16ФП только у томата и баклажана, а дроп-воздействия в условиях CL увеличивали ее у томата, но не баклажана (рис. 3а). За исключением огурца значения φPSII в варианте 24ФП были ниже, чем в варианте 16ФП, а в варианте 24ФП + дроп φPSII повышалось у томата и сладкого перца (рис. 3б).

У всех исследованных видов скорость нетто-ассимиляции CO_2 была существенно ниже в варианте 24ФП по сравнению с вариантом 16ФП (рис. 3в). У томата, сладкого перца и огурца дроп-воздействия способствовали повышению A_n до уровня растений варианта 16ФП. Независимо от

Таблица 1. Пигментный комплекс растений томата, баклажана, сладкого перца и огурца, выращенных при 16-часовом фотопериоде (16ФП), 24-часовом фотопериоде (24ФП) и 24-часовом фотопериоде с дроп-воздействиями (24ФП + дроп)

Показатель	16ФП	24ФП	24ФП+дроп
	Томат		
Хл *a* + *b*	17.1 ± 0.4^{a}	5.6 ± 1.0^{b}	10.8 ± 0.5^{a}
Хл *a*/*b*	2.5 ± 0.0^{b}	3.4 ± 0.1^{a}	2.4 ± 0.0^{b}
Кар	1.7 ± 0.0^{a}	1.8 ± 0.1^{a}	1.6 ± 0.1^{a}
Хл/Кар	10.1 ± 0.1^{a}	3.1 ± 0.1^{c}	6.8 ± 0.1^{b}
Хл ССК	64 ± 0^{a}	52 ± 1^{b}	62 ± 2^{a}
	Баклажан		
Хл *a* + *b*	15.0 ± 0.9^{a}	12.6 ± 0.7^{a}	13.5 ± 1.2^{a}
Хл *a*/*b*	2.7 ± 0.1^{a}	3.0 ± 0.1^{a}	2.7 ± 0.1^{a}
Кар	1.8 ± 0.1^{a}	1.5 ± 0.2^{a}	1.8 ± 0.2^{a}
Хл/Кар	8.3 ± 0.1^{a}	8.4 ± 0.01^{a}	7.5 ± 0.1^{b}
Хл ССК	59 ± 1^{a}	56 ± 1^{b}	60 ± 1^{a}
	Перец		
Хл *a* + *b*	17.7 ± 1.2^{b}	25.3 ± 2.1^{a}	23.2 ± 1.5^{a}
Хл *a*/*b*	3.4 ± 0.1^{c}	4.5 ± 0.1^{a}	4.0 ± 0.1^{b}
Кар	4.1 ± 0.2^{c}	6.5 ± 0.3^{a}	5.0 ± 0.2^{b}
Хл/Кар	4.3 ± 0.01^{a}	3.9 ± 0.01^{b}	4.6 ± 0.1^{a}
Хл ССК	66 ± 2^{a}	63 ± 2^{ab}	61 ± 2^{b}
	Огурец		
Хл *a* + *b*	21.5 ± 0.5^{a}	19.2 ± 0.3^{b}	21.5 ± 0.8^{a}
Хл *a*/*b*	1.5 ± 0.1^{a}	1.7 ± 0.2^{a}	1.6 ± 0.1^{a}
Кар	2.1 ± 0.1^{a}	1.8 ± 0.2^{a}	1.9 ± 0.1^{a}
Хл/Кар	0.10 ± 0.01^{a}	0.09 ± 0.01^{a}	0.09 ± 0.0^{a}
Хл ССК	88 ± 4^{a}	85 ± 2^{a}	84 ± 5^{a}

Примечание: различные буквы указывают на достоверность различий средних значений при $P < 0.05$.

вида растений, величина g_s была самой низкой в варианте 24ФП, а ее изменения под влиянием дроп-воздействий соответствовали изменениям скорости A_n (рис. 3г). Оба исследованных фактора (фотопериод и дроп-воздействия) мало влияли на соотношение C_i/C_a у баклажана, но у томата эта величина была наибольшей в варианте 24ФП, а у перца и огурца – в варианте 24ФП+дроп (рис. 3д).

ОБСУЖДЕНИЕ

Продолжительное выращивание растений, чувствительных к длинным фотопериодам, в условиях CL и постоянной температуры приводит к фотоповреждению листьев в виде хлороза и некроза и фотоингибированию фотосинтетического аппарата (ФСА), что становится причиной снижения накопления биомассы. Такая реакция растений на CL неоднократно описывалась в литературе [1–3, 12–19]. Однако исследованные виды растений несколько отличались между собой в отклике на CL. Например, визуально оцениваемая реакция листьев варьировала, проявляясь в виде эпинастии, хлороза, некроза, морщинистости или симптомов оэдемы. В то же время, практически у всех исследованных видов в условиях CL и постоянной температуры наблюдалось снижение скорости фотосинтеза, которое происходило в отсутствие устьичного лимитирования, о чем свидетельствовали значения содержания CO_2 в межклеточном пространстве и соотношения C_i/C_a в листьях растений. Пигментный комплекс растений с разной степенью достоверности демонстрировал обусловленные CL изменения, которые можно характеризовать как защитно-приспособительную реакцию организма на избыточное освещение. К ним относятся снижение содержания Хл, увеличение соотношения Хл *a*/*b*, уменьшение соотношения Кар/Хл и доли Хл ССК. В нашем случае отмеченные изменения в пигментном комплексе, флуоресценции хлорофилла и фотосинтетической активности говорят о более высокой чув-

ствительности ФСА томата и баклажана к CL, чем у сладкого перца и огурца. Причины развития хлороза и некроза листьев и фотоингибирования в условиях CL до сих являются предметом дискуссии. Предполагают, что в процессе появления и развития фотоповреждений, вызванных CL, участвует не один, а несколько механизмов, таких как фотоокисление, стресс-индуцированное старение, циркадная асинхрония и др. [8]. При этом удельный вклад каждого из этих механизмов может варьировать в зависимости от биологических особенностей объекта и условий внешней среды.

Как показало данное исследование, применение дроп-воздействий при выращивании растений в условиях CL предотвращало развитие фотоповреждений листьев у всех изученных видов. Кроме того, дроп-воздействия препятствовали снижению активности фотосинтеза у всех видов, кроме баклажана. Обусловленное дроп-воздействиями повышение фотосинтетической активности сопровождалось увеличением LMA, а более быстрое накопление баклажаном биомассы на фоне снижения скорости фотосинтеза при CL может быть связано с повышением скорости появления листьев и их большим количеством. В варианте 24ФП + дроп бóльшее накопление биомассы происходило, по-видимому, за счет повышения значений LMA. И хотя у баклажана не было выявлено статистически значимого влияния дроп-воздействий на многие исследованные в данной работе показатели, тем не менее прослеживаются те же тенденции в их изменениях, которые характерны для других видов: увеличение содержания Хл, уменьшение соотношения Хл *a/b*, увеличение доли Хл ССК, рост LMA. При этом, как и у других видов, листья растений баклажана, выращенных в варианте с дроп-воздействиями, не имели явно выраженных признаков фотоповреждений, что говорит о явно положительном эффекте дроп-воздействий на этот вид. Вероятно, параметры дроп-воздействий (интенсивность и/или продолжительность), применяемые в данной работе, оказались для баклажана не вполне оптимальными для того, чтобы оказать более сильное стабилизирующее влияние на ФСА при CL. Вполне возможно, что более низкая температура дроп-воздействий или их большая продолжительность привели бы к более четко выраженному позитивному эффекту. Ранее нами уже было показано влияние параметров дроп-воздействий на реакцию растений. Например, эффективность дроп-воздействий в предотвращении развития хлороза листьев у томата при CL в бóльшей степени зависела от абсолютного значения, до которого снижается температура, чем от величины градиента температур [31]. Из ряда других работ известно, что переменные суточные температуры в той или иной степени предотвращают развитие хлороза листьев в условиях CL у некоторых растений семейства *Solanaceae*, включая томаты, если градиент термопериода составляет более 8°C [12, 13, 18, 32]. В то же время дроп-воздействия неэффективны и не предотвращают развитие хлороза, если “нижняя температура” не относится к диапазону закаливающих температур, даже когда величина градиента достаточно велика (более 8°C). Добавим, что возрастная изменчивость в чувствительности растений к CL [21] также способна влиять на отклик растений на дроп-воздействия. Наконец, стоит отметить и то, что дроп-воздействия не обладают выраженным последействием и полностью нивелируют или ослабляют повреждающее действие CL на растения только в период своего действия [31].

Необходимо сказать и о том, что в условиях CL инициируется более раннее плодоношение культурных растений [28], а применение дроп-воздействий увеличивает раннюю урожайность [33]. С учетом более высокой реализационной цены на раннюю продукцию это обеспечивает повышение экономической эффективности производства. В основе положительного эффекта дроп-воздействий на работу ФСА в условиях CL, как нам представляется, лежит защитно-приспособительная реакция, которая сходна с неспецифическим ответом на стресс. При этом конкретные механизмы дроп-воздействий на растения при CL могут быть разными, включая, в частности, активизацию антиоксидантной системы [34] и альтернативного пути дыхания [35], что препятствует накоплению избыточного количества АФК и деградации хлорофилла [36]. Обусловленное дроп-воздействиями снижение эффективности использования световой энергии на фотосинтез также может выступать как один из механизмов защиты ФСА от избыточного света при CL [37]. Добавим, что в условиях CL неизбежен дисбаланс между поступающей и используемой растениями световой энергии и, как следствие, нарушение донорно-акцепторного баланса в хлоропластах. Восстановление баланса возможно за счет появления дополнительных акцепторов электронов и усиления стока продуктов фотосинтеза для формирования новых структур [38]. Кроме того, ежесуточные понижения температуры могли инициировать изменения в составе продуктов фотосинтеза, способствовать синтезу более энергоемких продуктов [39] и формированию более резистентной к холоду структуры хлоропластов и клеток. Как правило, такого рода изменения сопровождаются усилением стока, стабилизирующим донорно-акцепторные отношения [40] и также могут играть определенную роль в поддержании активности ФСА растений в условиях CL.

Резюмируя результаты проведенных исследований, следует подчеркнуть что, несмотря на определенные различия в реакции четырех видов исследованных растений на CL при постоянной температуре, применение дроп-воздействий обеспечивало

снижение негативных эффектов CL, предотвращая фотоповреждение листьев у всех видов. Дроп-воздействия способствовали сохранению активности фотосинтеза при CL у перца, томата и огурца, но не баклажана, по-видимому, вследствие их разной устойчивости к действующим факторам (фотопериод, температура). Полученные результаты подтверждают сделанный применительно к томату вывод о возможности использования дроп-воздействий в качестве агротехнического приема, позволяющего реализовать потенциальные преимущества CL при выращивании культурных растений в контролируемых условиях, нивелировав его возможные отрицательные эффекты [26–28, 31, 33]. Данный вывод, помимо практической значимости, подтверждает, что фотоповреждение растений в условиях CL является не только ответной реакцией на свет как таковой, а на совместное действие фотопериода и температуры. Эти факторы оказывают на растения воздействие, степень и характер которого может существенно варьировать в зависимости от их параметров и устойчивости к ним конкретного вида. Поэтому практическое применение дроп-воздействий в сочетании с CL в качестве агротехнического приема, требует проведения специальной работы по выявлению для каждого вида растений оптимальной интенсивности и продолжительности дроп-воздействий.

Исследования выполнены при финансовой поддержке государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-004) на научном оборудовании 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. *Sysoeva M.I., Markovskaya E.F., Shibaeva T.G.* Plants under continuous light: A review // Plant Stress. 2010. V. 4. P. 5.
2. *Velez-Ramirez A.I., van Ieperen W., Vreugdenhil D., Millenaar F.F.* Plants under continuous light // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 310. http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tplants.2011.02.003
3. *Hague M.S., Kjaer K.H., Roserqvist E., Ottosen C.O.* Continuous light increases growth, daily carbon gain, antioxidants, and alters carbohydrate metabolism in a cultivated and a wild tomato species // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 522. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00522
4. *Ohtake N., Ishikura M., Suzuki H.* Continuous irradiation with alternating red and blue light enhances plant growth while keeping nutritional quality in lettuce // Hort. Sci. 2018. V. 53. P. 1804. https://doi.org/10.21273/HORTSCI13469-18
5. *Lanoue J., Zheng J., Little C., Thibodeau A., Grodzinski B., Hao X.* Alternating red and blue light-emitting diodes allows for injury-free tomato production with continuous lighting // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 1114. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01114
6. *Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Sherudilo E.G., Titov A.F.* The role of the photosynthetic daily light integral in plant response to extended photoperiods // Russ. J. Plant Physiol. 2022. V. 69. P. 7. https://doi.org/10.1134/S1021443722010216
7. *Shibaeva T.G., Sherudilo E.G., Rubaeva A.A., Titov A.F.* Continuous lighting enhances yield and nutritional value of four genotypes of *Brassicaceae* microgreens // Plants. 2022. V. 11. P. 176. https://doi.org/10.3390/plants11020176
8. *Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Titov A.F.* Possible physiological mechanisms of leaf photodamage in plants grown under continuous lighting // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70. P. https://doi.org/10.31857/S0015330322600541
9. *Kitaya Y., Niu G., Kozai T., Ohashi M.* Photosynthetic photon flux, photoperiod, and CO_2 concentration affect growth and morphology of lettuce plug transplants // Hort. Sci. 1998. V. 33. P. 988. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.33.6.988
10. *Ohyama K., Kozai T.* Estimating electric energy consumption and its cost in a transplant production factory with artificial lighting: a case study // J. Soc. High Technol. Agr. 1998. V. 10. P. 96.
11. *Ohyama K., Manabe K., Omura Y., Kubota C., Kozai T.* A comparison between closed-type and open-type transplant production systems with respect to quality of tomato plug transplants and resource consumption during summer // Environ. Control Biol. 2003. V. 41. P. 57. https://doi.org/10.2525/ecb1963.41.57
12. *Ohyama K., Manabe K., Omura Y., Kozai T.* Potential use of a 24-hour photoperiod (continuous light) with alternating air temperature for production of tomato plug transplants in a closed system // Hort. Sci. 2005. V. 40. P. 374. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.2.374
13. *Hillman W.S.* Injury of tomato plants by continuous light and unfavorable photoperiodic cycles // Amer. J. Bot. 1956. V. 43. P. 89. https://doi.org/10.2307/2438816
14. *Bradley F.M., Janes H.W.* Carbon partitioning in tomato leaves exposed to continuous light // Acta Hort. 1985. V. 174. P. 293. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.174.37
15. *Vézina F., Trudel M.J., Gosselin A.* Influence du mode d’utilisation de l’éclairage d’appoint sur la productivité et la physiologie de la tomate de serre // Can. J. Plant Sci. 1991. V. 71. P. 923. https://doi.org/10.4141/cjps91-132
16. *Murage E.N., Sato Y., Masuda M.* Influence of light quality, PPFD, and temperature on leaf chlorosis of eggplants grown under continuous illuminations // Sci. Hort. 1997. V. 68. P. 73. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00953-3

17. *Demers D.A., Gosselin A.* Growing greenhouse tomato and sweet pepper under supplemental lighting: optimal photoperiod, negative effects of long photoperiod and their causes // Acta Hort. 2002. V. 580. P. 83. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.580.9
18. *Ohyama K., Omura Y., Kozai T.* Effects of air temperature regimes on physiological disorders and floral development of tomato seedlings grown under continuous light // Hort. Sci. 2005. V. 40. P. 1304. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.5.1304
19. *Matsuda R., Ozawa N., Fujiwara K.* Leaf photosynthesis, plant growth, and carbohydrate accumulation of tomato under different photoperiods and diurnal temperature differences // Sci. Hort. 2014. V. 170. P. 150. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.014
20. *Hague M., de Sousa A., Soares C., Kjaer K.H., Fidalgo F., Rosenqvist E., Ottosen C.-O.* Temperature variation under continuous light restores tomato leaf photosynthesis and maintains the diurnal pattern in stomatal conductance // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1602. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01602
21. *Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Sherudilo E.G., Ikkonen E.N., Titov A.F.* Age-related changes in sensitivity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaves to continuous light // Russ. J. Plant Physiol. 2021. V. 68. P. 948. https://doi.org/10.1134/S1021443721040154
22. *Tibbitts T.W., Bennett S.M., Cao W.* Control of continuous irradiation injury on potato with daily temperature cycling // Plant Physiol. 1990. V. 93. P. 409. https://doi.org/10.1104/pp.93.2.409
23. *Kristoffersen T.* Interactions of photoperiod and temperature in growth and development of young tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) // Physiol. Plant. 1963. V. 16. P. 1.
24. *Nilwik H.J.M.* Growth analysis of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) 2. Interacting effects of irradiance, temperature and plant age in controlled conditions // Ann. Bot. 1981. V. 48. P. 136. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086107
25. *Bünning E.* Untersuchungen uber die autonomen tagesperiodischen Bewegungen der Primarblatten von *Phaseolus multiflorus* // Jahrbücher für wissenchaftiche Botanik. 1931. V. 75. P. 439.
26. *Ikkonen E.N., Shibaeva T.G., Rosenqwist E., Ottosen C.-O.* Daily temperature drop prevents inhibition of photosynthesis in tomato plants under continuous light // Photosynthetica. 2015. V. 53. P. 389. https://doi.org/10.1007/s11099-015-0115-4
27. *Sysoeva M.I., Shibaeva T.G., Sherudilo E.G., Ikkonen E.N.* Control of continuous irradiation injury on tomato plants with a temperature drop // Acta Hort. 2012. V. 956. P. 283. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.956.32
28. *Shibaeva T.G., Sherudilo E.G.* Immediate and delayed effects of diurnal temperature drops on growth and reproductive development of tomato plants grown under continuous lighting // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 328. https://doi.org/10.1134/S1021443715030176
29. *Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R.* Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // Biochem. Soc. 1983. V. 603. P. 591. https://doi.org/10.1042/bst0110591
30. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 350. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1
31. *Shibaeva T.G., Markovskaya E.F., Ikkonen E.N., Sherudilo E.G.* Control of continuous irradiation injury on tomato plants with a temperature drop: effectiveness evaluation // Russ. Agric. Sci. 2015. V. 41. P. 419. https://doi.org/10.3103/S1068367415060221
32. *Omura Y., Oshima Y., Kubota C., Kozai T.* Treatments of fluctuating temperature under continuous light enabled the production of quality transplants of tomato, eggplant and sweet pepper // Hort. Sci. 2001. V. 36. № 3. P. 586.
33. *Сысоева М.И., Шибаева Т.Г., Шерудило Е.Г.* Способ выращивания рассады томата в защищенном грунте // Бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. 2013. № 28. 6 с.
34. *Шибаева Т.Г., Шерудило Е.Г., Икконен Е.Н., Титов А.Ф.* Влияние кратковременных ежесуточных понижений температуры на активность антиоксидантных ферментов // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2015. № 12. С. 107. https://doi.org/10.17076/eb241
35. *Ikkonen E.N., Sherudilo E.G., Shibaeva T.G., Grabelnykh O.I.* Salicylhydroxamic acid-resistant and sensitive components of respiration in chilling-sensitive plants subjected to a daily short-term temperature drop // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 60. https://doi.org/10.1134/S1021443719050066
36. *Garmash E.V.* Mitochondrial respiration of the photosynthesizing cell // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 13. https://doi.org/10.1134/S1021443715060072
37. *Икконен Е.Н., Шибаева Т.Г., Шерудило Е.Г., Титов А.Ф.* Влияние ДРОП-воздействий на эффективность использования световой энергии в процессе фотосинтеза у растений огурца // Труды КарНЦ РАН. Серия “Экспериментальная биология”. 2016. № 6. С. 49. https://doi.org/10.17076/eb319
38. *Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I.* Relationship between plant cold tolerance, photosynthesis and ultrastructural modifications of cells and chloroplasts // Russ. J. Plant Physiol. 1997. V. 44. P. 759.
39. *Марковская Е.Ф., Шерудило Е.Г., Рипатти П.О., Сысоева М.И.* Роль липидов в устойчивости семядольных листьев огурца к постоянному и кратковременному периодическому действию низкой закаливающей температуры // Труды Кар НЦ РАН. Серия биологическая. 2009. № 3. С. 67.
40. *Климов С.В., Трунова Т.И., Мокроносов А.Т.* Механизм адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды через изменение донорно-акцепторных отношений // Физиология растений. 1990. Т. 37. С. 1024.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 410–416

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА РОСТ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ВАСИЛИСТНИКА МАЛОГО (*Thalictrum minus* L.)

© 2023 г. Е. А. Осипова*

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

**e-mail: eleang@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.01.2023 г.
После доработки 15.02.2023 г.
Принята к публикации 15.02.2023 г.

Берберин соединение с широким спектром биологической активности, синтезируется в культуре клеток лекарственного растения *Thalictrum minus*. Исследовали влияние абиотического элиситора (Cu^{2+}) на рост культуры клеток *Thalictrum minus* и биосинтез в ней протоберберинoвых алкалоидов на разных стадиях ростового цикла. Оценивали быструю реакцию (через 2 ч) и продолжительную (в конце ростового цикла). Наибольший эффект по увеличению протоберберинoвых алкалоидов наблюдали после воздействия (Cu^{2+}) 20, 25 мг/л в 0 день через 2 ч, на 49 и 114% выше контроля, соответственно, при сохранении роста на уровне контроля. К концу ростового цикла масса клеток и содержание протоберберинoвых алкалоидов снижались на 67–70 и 27–53%, соответственно (токсичный эффект). При 5 мг/л (Cu^{2+}), реакция была противоположная. Через 2 ч наблюдали стимуляцию роста на 48% и снижение содержания протоберберинoвых алкалоидов на 48% по отношению к контролю. К концу ростового цикла сохранялось превышение роста на 50%, а содержание протоберберинoвых алкалоидов повышалось на 60% по отношению к контролю. Если воздействие Cu^{2+} проводили в середине ростового цикла, при концентрации 20, 25 мг/л, как при быстрой реакции (через 2 ч), так и к концу ростового цикла, происходило снижение роста на 65–71% и содержания протоберберинoвых алкалоидов на 52–70%. При 5 мг/л ионов меди сохранялось превышение роста на 50–54%, содержание алкалоидов оставалось на уровне контроля. Реакция при 10 мг/л ионов Cu^{2+} была промежуточной. Проведенные исследования показали перспективность применения низких концентраций ионов меди для культуры клеток *Thalictrum minus*. Содержание протоберберинoвых алкалоидов повышалось на фоне стимуляции роста культуры клеток в конце ростового цикла.

Ключевые слова: *Thalictrum minus*, ионы меди, суспензионная культура клеток, протоберберинoвые алкалоиды, элиситор

DOI: 10.31857/S0015330323600055, **EDN:** PZWWYA

ВВЕДЕНИЕ

Берберин – протоберберинoвый алкалоид изохинолиновой группы [1] обладает широким спектром биологической активности. Среди свойств отмечены антимикробные [2] (ингибирование токсинов и бактерий, в том числе *Helicobacter pylori* [3]), противоопухолевые [4–7], желчегонные [1], выявлена его антиоксидантная активность [5]. Исследуется применение берберина в качестве антидепрессанта [8], также для снижения уровня холестерина в крови [9, 10], при болезни Альцгеймера [11–13]. Берберин регулирует гликометаболизм и липидный обмен [3]. Берберин синтезируется в растениях разных семейств *Berberidaceae, Ranunculaceae, Menispermaceae, Rutaceae, Papaveraceae* [2]. *Василистник малый* (*Thalictrum minus* L.) – лекарственное растение семейства лютиковых (*Ranunculaceae*), широко распространено на территории России и в других странах средней полосы. Листья и корни растения применяются в тибетской медицине при отеках, водянке, женских болезнях. Трава василистника малого входит в состав сбора Здренко [14]. В культуре клеток растения василистника малого берберин может достигать 0.67% от сухой массы клеток [15, 16]. Это ниже, чем в интактном растении. Однако это свойство неорганизованных пролифирирующих клеток растения, в которых содержание искомых веществ может быть на порядок ниже, чем в органах целого растения [17]. Поэтому встает проблема повышения содержания вторичных метаболитов в культуре клеток растения. Для суспензионной культуры клеток *Thalictrum minus* это достигалось за счет воздействия регуляторов роста. Было по-

Сокращения: 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, НУК – 1-нафтилуксусная кислота, IPT – изопентениладенинтрансфераза, ООК – объем осажденных клеток.

казано, что цитокинины в сочетании с НУК (1-нафтилуксусная кислота) или 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) повышали содержание берберина [18, 19]. Но именно цитокинины стимулировали превращение предшественника Ĺ-тирозина в берберин [19], активировали (S)-тетрагидропротоберберинoксидазу – фермент биосинтеза берберина [20]. На основании этих данных была разработана схема агробактериальной трансформации каллусной культуры клеток василистника малого с *ipt* геном, участвующем в биосинтезе цитокининов, и показана возможность получения клеточных линий с более высоким содержанием протоберберинoвых алкалоидов [21]. Основываясь на гетерогенности культур клеток растения, проводили клонирование и отбор перспективных по уровню содержания протоберберинoвых алкалоидов клеточных линий [22]. Еще одно из направлений, проводимых с целью повышения содержания вторичных соединений в культуре клеток растений – элиситация. К элиситорам относят несвойственные для растений молекулы, связанные с патогенами, вредителями [23], физическими факторами и химическими веществами, включая тяжелые металлы [24]. Среди тяжелых металлов отмечена медь [24]. Исследований по влиянию ионов меди на суспензионные культуры лекарственных растений немного. Однако в этих работах было показано, что под влиянием ионов меди можно повышать содержание вторичных метаболитов в суспезионных культурах *Beta vulgaris* (беталаинов) [24], *Angelica archangelica* (скополетина) [25], *Agave amanuensis* (гекогенина) [26], *Portulaca* (бетацианинов) [27], *Tribulus terrestris* L. (стероидных гликозидов) [28]. Исследований по влиянию ионов меди на содержание протоберберинoвых алкалоидов в суспензионной культуре *Thalictrum minus* в литературных источниках не найдено. В то же время было показано, что содержание протоберберинoвых алкалоидов повышалось в суспензионной культуре *Thalictrum minus* после воздействия другим элиситором, в результате инфицирования мицелиальными грибами [29]. Это могло указывать на то, что культура клеток *Thalictrum minus* чувствительна к элиситации. Необходимо отметить, что в низких концентрациях медь выступает эссенциальным элементом, необходимым для метаболизма клеток. В концентрации 0.1 мкМ медь включена в состав микроэлементов питательной среды по прописи Мурасиге и Скуга [30]. В биосинтезе протоберберинoвых алкалоидов медьсодержащий фермент – фенолаза, участвует в реакциях гидроксилирования тирамина в дофамин и (S) и (R) – формы N-метилкоклаурина с последующим метилированием (S) форм в (S)-ретикулин [31, 32]. Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния ионов меди на суспензионную культуру клеток *Thalictrum minus* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила суспензионная культура клеток *Thalictrum minus L.*, штамм 233, полученный после клонирования исходной суспензионной культуры и отбора клеточной линии с более высоким уровнем содержания протоберберинoвых алкалоидов [22]. Штамм культивируется более 20 лет. Суспензионную культуру выращивали на модифицированной МС-среде [30] с добавлением витаминов по прописи Стаба [33] 10 мл/л, что соответствовало содержанию цианокабаламида NaCl 0.0015 мг/л (“Борисовский завод медицинских препаратов”, Беларусь), фолиевой кислоты 0.5 мг/л (“Applichem”, Германия), рибофлавина 0.5 мг/л (“Applichem”, Германия), Са-пантотената 1.0 мг/л (“Sigma-Aldrich”, США), пиридоксина гидрохлорида (“Acros organics”, Бельгия), тиамина гидрохлорида 1.0 мг/л (“Applichem”, Германия), никотиновой кислоты 2.0 мг/л (“Sigma-Aldrich”, США). Исключали из состава витаминов по прописи Стаба биотин и холинхлорид. Среда включала 2,4-Д (2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота) 0.01 мг/л (“Sigma-Aldrich”, США), сахарозу 5%. Суспензионную культуру выращивали в темноте, на качалке при 100 об/мин в колбах объемом 250 мл с заполнением средой 60 мл. Соотношение инокулюма : среды было 1 : 6. Цикл субкультивирования 17 дней. Рост суспензионной культуры определяли двумя способами: (1) по сухой массе клеток после отделения от культуральной жидкости через бумажный фильтр под вакуумом, далее клетки снимали с фильтра и сушили в термостате (“ТС-80”, Россия) при температуре 60°С в течение трех суток, взвешивали на аналитических весах (“Scout Pro”, США); (2) по объему осажденных клеток (ООК) – суспензионную культуру переносили в мерные пробирки и оставляли на 2 ч. Для оценки роста клеток на агаровой среде клетки суспензионной культуры на 17 день ростового цикла стерильно в ламинар-боксе (“КПГ-1М”, СССР) фильтровали через лабораторную воронку с фильтром из тканевого волокна “бязь”. Отфильтрованные клетки массой 80 мг, переносили на среду такого же состава, что и для культивирования суспензионной культуры, с добавлением 0.7% агара в чашки Петри диаметром 9 см по 10 кусочков в каждую чашку, по 4 чашки в каждом варианте. Выживаемость клеточных конгломератов определяли по числу живых, имеющих характерную светло-желто-зеленоватую окраску, от числа исходно посаженных. Раствор меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (“Реахим”, Россия) в среду (жидкую и агаровую) добавляли стерильно в пересчете на ионы меди в диапазоне от 5 до 30 мг/л (5, 10, 20, 25, 30 мг/л), что соответствовало Cu^{2+} 78, 156, 312, 390, 468 мкМ. Раствор ионов меди вносили в жидкую и агаровую среду перед посадкой культуры клеток (0 день) и на 10 день ростового цикла суспензионной культуры.

Таблица 1. Выживаемость и рост клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) при поверхностном стационарном выращивании после добавления в среду с агаром разной концентрации ионов меди через 8 недель культивирования

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25	30
Выживаемость от числа исходно посаженных конгломератов клеток, %	25 ± 7	75 ± 7*	68 ± 7*	25 ± 7	0	0
Масса живых клеток, % к контролю	100	207 ± 9*	93 ± 4	93 ± 4		
Масса живых клеток, мг	80 ± 0	166 ± 7*	74 ± 3	74 ± 3		

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * – разница достоверна при $P < 0.05$.

Таблица 2. Рост суспензионной культуры клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) к 17 дню культивирования (конец ростового цикла) на разных концентрациях ионов меди

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
ООК, мл	2.80 ± 0.16	2.90 ± 0.20	0.60 ± 0.11*	0.50 ± 0*	0.40 ± 0*
% к контролю	100	104 ± 7	21 ± 0*	19±0*	14 ± 0*

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * – разница достоверна при $P < 0.05$.

Для определения содержания протоберберинoвых алкалоидов в суспензионной культуре клеток применяли спектрофотометрический метод. Содержание протоберберинoвых алкалоидов определяли в этанольных экстрактах сырой массы клеток и в культуральной среде. К 500 мг сырой массы клеток добавляли 5 мл этанола дважды с интервалом 1 сут. до полного обесцвечивания клеток. Культуральную жидкость предварительно замораживали при –20°С, оттаивали, центрифугировали при 8000 об/мин, 15 мин на центрифуге (“Опн”, Россия). Проводили спектрофотометрическое определение культуральной жидкости и этанольных экстрактов из клеток на спекторофотометре (“UNICO”, США) при длине волны 427 нм [34]. Для каждого варианта проводили три аналитические и три биологических повторности. Статистическую обработку, вычисление средних значений, стандартную ошибку и *t*-значения Стьюдента проводили по стандартным методам с использованием MS-Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы определяли чувствительность клеток к разным концентрациям ионов меди при разных условиях выращивания. Оценивали рост суспензионной культуры (глубинное выращивание), выживаемость и рост конгломератов клеток, полученных из культуры клеток, при поверхностном стационарном выращивании на среде с агаром (табл. 1, 2). После переноса клеток из суспензии на агаровую среду выживаемость на контрольной среде была невысокой – 25%. Добавление в среду 5 и 10 мг/л ионов меди повышали выживаемость клеток до 75 и 68%, соответственно. При 20 мг/л ионов меди рост и выживаемость клеток соответствовали контрольному уровню, тогда как при 25 и 30 мг/л ионов меди происходила гибель клеток. Увеличение массы клеток в 2 раза отмечено при концентрации ионов меди – 5 мг/л среды, тогда как при 10 и 20 мг/л масса клеток соответствовала контрольному уровню. В суспензионной культуре (глубинное выращивание) отмечено сохранение роста на уровне контроля при концентрации ионов меди – 5 мг/л, тогда как 10, 20 и 25 мг/л – сублетальные. Несмотря на разные критерии оценки роста при поверхностном выращивании (сухая масса клеток) и в суспензионной культуре (ООК), можно отметить, что 5 мг/л ионов меди не оказывали негативного воздействия. Снижение роста при поверхностном выращивании было на более высоких концентрациях ионов меди, чем в суспензионной культуре.

Определяли влияние разных концентраций ионов меди на биосинтез протоберберинoвых алкалоидов в суспензионной культуре василистника малого (*Thalictrum minus* L.) после внесения в среду на разных фазах ростового цикла, в начале (0 день), в середине (10 день), через 2 ч (быстрая реакция) и на 17 день культивирования (продолжительное воздействие). Через 2 ч культивирования после внесения в среду ионов меди в 0 день ростового цикла, наблюдали стимулияцию роста только при 5 мг/л на 48%, по отношению к контролю. Содержание протоберберинoвых алкало-

Таблица 3. Влияние на рост и содержание протоберберинoвых алкалоидов в суспензионной культуре клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) разных концентраций ионов меди через 2 ч культивирования после пересадки (0 день ростового цикла)

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
Сухая масса клеток, г/л	0.29 ± 0.01	0.43 ± 0*	0.30 ± 0	0.34 ± 0,04	0.28 ± 0.01
Сухая масса клеток, % к контролю	100	148 ± 0*	104 ± 0	117 ± 14	97 ± 4
Протоберберинoвые алкалоиды (среда + клетки), % от сухой массы клеток	0.68 ± 0.04	0.35 ± 0.01*	0.71 ± 0.11	1.02 ± 0.23	1.45 ± 0.01*
Протоберберинoвые алкалоиды (среда + клетки), % к контролю	100	52 ± 2*	104 ± 17	149 ± 34	214 ± 15*

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * – разница достоверна при $P < 0.1 - 0.05$.

Таблица 4. Влияние на рост и содержание протоберберинoвых алкалоидов в суспензионной культуре клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) разных концентраций ионов меди через 17 дней культивирования (конец ростового цикла)

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
Сухая масса клеток, г/л	3.30 ± 0.70	4.96 ± 0.14*	3.47 ± 0.12	1.07 ± 0.15*	0.97 ± 0.10*
Сухая масса клеток, % к контролю	100	150 ± 4*	105 ± 4	33 ± 5*	30 ± 3*
Протоберберинoвые алкалоиды (среда + клетки), % от сухой массы клеток	0.16 ± 0.04	0.26 ± 0.02*	0.09 ± 0.01*	0.12 ± 0.01	0.07 ± 0.01*
Протоберберинoвые алкалоиды (среда + клетки), % к контролю	100	160 ± 13*	59 ± 5*	73 ± 9	47 ± 9*

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * – разница достоверна при $P < 0.1 - 0.05$.

идов, при этой концентрации, наоборот, было ниже на 48%. Значительное повышение содержания протоберберинoвых алкалоидов наблюдали при высокой концентрации ионов меди (25 мг/л) на 114% и сохранение роста на уровне контроля (табл. 3). При продолжении культивирования до конца ростового цикла (до 17 дня) с теми же концентрациями ионов меди, можно было отметить, что только при 5 мг/л сохранялась стимуляция роста, а содержание протоберберинoвых алкалоидов превышало контрольный уровень на 60%. Повышение концентрации ионов меди приводило к динамичному снижению, как роста, так и содержания протоберберинoвых алкалоидов, максимально при 25 мг/л на 70 и 53%, соответственно (табл. 4). Если ионы меди вносили в середине ростового цикла на 10 день, то при высоких концентрациях 20 и 25 мг/л происходило снижение роста и содержания протоберберинoвых алкалоидов, как через короткое время (через 2 ч), так и после выдерживания до конца ростового цикла (до 17 дня). При более низких концентрациях ионов меди, 5 мг/л, отмечена только стимуляция роста и только через 2 ч после внесения ионов меди (табл. 5, 6). Таким образом, можно отметить, что ионы меди токсичны при высоких концентрациях, но приводят к быстрому повышению содержания протоберберинoвых алкалоидов в начале ростового цикла. Низкая концентрация приводит к стимуляции роста, а при продолжительном воздействии содержание протоберберинoвых алкалоидов превышало контрольный уровень. Из этого следует, что чувствительность клеток к ионам меди различается в зависимости от стадии ростового цикла. Более чувствительны к ионам меди были клетки, когда ионы меди вносили в начале ростового цикла, что приводило к повышению протоберберинoвых алкалоидов.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании наших исследований и других авторов следует, что для эффекта элиситации (ионов меди) имеет значение концентрация элиситора, длительность его действия, возраст культуры клеток. Анализ наших данных показывает, что быстрая и долговременная реакции на ионы меди различаются. При быстрой реакции высокие (20 и 25 мг/л) и низкая (5 мг/л) концентрации имели противоположный эффект после внесения в начале ростового цикла (0 день). Низкая концентрация стимулировала рост, тогда как высокие – повышали содержание алкалоидов. После продолжительного культивирования, до конца

Таблица 5. Влияние на рост и содержание протоберберинoвых алкалоидов в суспензионной культуре клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) разных концентраций ионов меди через 2 ч после внесения в среду на 10 день ростового цикла

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
Сухая масса клеток, г/л	2.60 ± 0.42	3.91 ± 0.32*	2.86 ± 0.15	1.08 ± 0.14*	0.74 ± 0.22*
Сухая масса клеток, % к контролю	100	150 ± 12*	110 ± 6	42 ± 6*	29 ± 9*
Протоберберинoвые алкалоиды (среда + клетки), % от сухой массы клеток	0.23 ± 0.09	0.26 ± 0.04	0.14 ± 0.04	0.11 ± 0.03*	0.07 ± 0.02*
Протоберберинoвые алкалоиды (среда + клетки), % к контролю	100	113 ± 17	61 ± 17	48 ± 13*	30 ± 9*

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * – разница достоверна при $P < 0.1–0.05$.

Таблица 6. Влияние на рост и содержание протоберберинoвых алкалоидов в суспензионной культуре клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) разных концентраций ионов меди в конце ростового цикла (на 17 день) культивирования, после внесения в среду на 10 день ростового цикла

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
Сухая масса клеток, г/л	3.30 ± 0.70	5.08 ± 0.17	4.28 ± 0.25	1.28 ± 0.19*	1.47 ± 0.25*
Сухая масса клеток, % к контролю	100	154 ± 36	130 ± 8	39 ± 6*	45 ± 9*
Протоберберинoвые алкалоиды (среда + клетки), % от сухой массы клеток	0.16 ± 0.04	0.16 ± 0	0.23 ± 0.05	0.04 ± 0.01*	0.08 ± 0*
Протоберберинoвые алкалоиды (среда + клетки), % к контролю	100	93 ± 15	138 ± 31	24 ± 7*	48 ± 0*

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * – разница достоверна при $P < 0.1–0.05$.

ростового цикла, при высоких концентрациях рост и содержание алкалоидов значительно снижались. То есть, наблюдали токсичный эффект высоких концентраций. При низкой концентрации стимуляция роста сохранялась, а содержание алкалоидов было выше контроля. Клетки суспензионной культуры середины ростового цикла были менее чувствительны к ионам меди. Однако стимуляция роста при низкой концентрации сохранялась. Для эффективного применения элиситоров в культуре клеток растения важно сочетание роста и биосинтеза вторичных соединений. Анализируя исследования других авторов по влиянию ионов меди на рост и содержание вторичных метаболитов, было показано, что для разных суспензионных культур клеток эффективная концентрация ионов меди различалась. Для суспензионной культуры клеток *Angelica archangelica* определяли влияние ионов меди в диапазоне 0.1–200 мкМ в темноте в конце ростового цикла. Концентрация до 100 мкМ ионов меди не влияли на рост. Снижение роста наблюдали при 200 мкМ на 30%, а концентрация 500 мкМ оказалась летальной. Концентрации 10, 50, 100 мкМ повышали содержание скополетина, максимально при 50 мкМ в 2 раза [25]. В суспензионной культуре клеток *Agava amanuensis* изучали влияние концентраций ионов меди в диапазоне от 10 до 240 мкМ. Рост снижался только при 240 мкМ на 61.5%. Содержание гекогенина повышалось на 59.7% при 20 мкМ [26]. В суспензионной культуре *Vaccinium pahalae* определяли влияние 10, 20, 40, 80 мкМ ионов меди. Рост сохранялся при всех концентрациях, но максимально повышался при 20 мкМ. При этой же концентрации максимально повышалось содержание антоцианов [35]. В культуре клеток *Tribulus terrestris* рост сохранялся до 10 мкМ ионов меди. Определение содержания фурастаноловых гликозидов определяли при 2 мкМ, при этой концентрации содержание фурастаноловых гликозидов повышалось в 1.5–3 раза [28]. Таким образом, можно отметить, что полученные нами данные не противоречат данным, полученным другими авторами для разных культур клеток. Во всех случаях при невысоких концентрациях ионов меди повышение вторичных метаболитов происходило на фоне роста культуры клеток в конце ростового цикла. Несмотря на то, что тяжелые металлы, в частности, медь, считаются токсичными, полученные результаты исследований говорят о том, что этот вопрос недостаточно изучен, в частности диапазон эффективных концентраций. На это указывает незначительное количество исследовательских работ в этом направлении и, как результат,

недооцененность эффективности воздействия невысоких концентраций на культуру клеток растений с целью повышения содержания вторичных метаболитов. Эффективными были концентрации ионов меди, показанные в исследованиях, значительно превышающие (на 2–2.5 порядка), традиционно применяемые в культуре клеток растений [30] и ниже на порядок токсичных концентраций [25, 26]. Известно, что воздействие элиситорами приводит к окислительному стрессу и активации защитных механизмов клеток [23, 24]. Различают дистресс (плохой стресс), который приводит к повреждению и гибели растений и эустресс (хороший стресс), который приводит к активации защитной реакции и активации вторичного метаболизма в соответствие с кривой гормезиса [36]. Интересен факт сохранения или стимуляции роста при повышении содержания вторичных соединений после воздействия невысоких концентраций ионов меди. Возможно, это связано со второй фазой реакции на стресс, фазой адаптации. В случае гетерогенности клеточных культур в разных клетках эти два процесса, защитный и адаптивный, проходят, возможно, независимо. Поэтому наблюдали накопление вторичных соединений на фоне роста культуры клеток в конце ростового цикла, то, чего не происходило после разрушающего действия высоких концентраций ионов меди. Полученные результаты могут указывать на перспективность применения низких концентраций элиситора (ионов меди) в культуре клеток лекарственных растений, так как происходит повышение содержания вторичных метаболитов при сохранении роста культуры клеток.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Максютина Н.П., Комиссаренко Н.Ф., Прокопенко А.П., Погодина Л.И., Липкан Г.Н.* Растительные лекарственные средства. Киев.: Здоровя. 1985. С. 280.
2. *Холина А.Б., Журавлев Ю.Н.* Культура клеток растений, как источник протопротоберберинового алкалоидов // Растительные ресурсы. 1996. Вып. 1. С. 134.
3. *Song D., Hao J., Fan D.* Biological properties and clinical applications of berberine // Front Med. 2020. V. 14. P. 564. https://doi.org/10.1007/s11684-019-0724-6
4. *Потопальский А.И., Петличная Л.И., Ивасивка С.В.* Барбарис и его препараты в биологии и медицине. Киев.: Изд-во Наук. думка. 1989. С. 287.
5. *Thirupurasundari C.J., Padmini R., Devaraj S.N.* Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-inuced colon cancer in rat // Chemico-Biological Interactions. 2009. V. 177. P. 190. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.027
6. *Rauf A., Abu-Izneid T., Khalil A.A., Imran M., Shah Z.A., Mitra S., Khan Z., Alhumaydhi F.A., Aljohani A.S M., Rahman Md.M., Jeandet P., Gonda T.A.* Berberine as a potential anticancer agent: a comprehensive review // Molec. 2021. V. 26. P. 7368. https://doi.org/10.3390/molecules26237368
7. *Xiong R.G., Huang S.Y., Wu S.X., Zhou D.D., Yang Z.J., Saimaiti A., Zhao C.N., Shang A., Zhang Y.J., Gan R.Y., Li H.B.* Anticancer effect and mechanism of berberine from medicinal herbs: an update review // Molec. 2022. V. 15. P. 4523. https://doi.org/10.3390/molecules27144523
8. *Kulkarni S.K., Dhir A.* On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride // Europ. Pharmacol. 2008. V. 589. P. 163. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.043
9. *Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M., Inaba S., Li C., Wang Y., Wang Z., Si S., Pan H., Wang S., Wu J., Wang Y., Li J., Jiang J.D.* Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 1344. https://doi.org/10.1038/nm1135
10. *Jia X., Chen Y., Zidichouski J., Zhang J., Sun C., Wang Y.* Co-administration of berberine and plant stanols synergistically reduces plasma cholesterol in rat // Atherosclerosis. 2008. V. 201. P. 101.
11. *Jiang W.X., Li S.H., Li X.J.* Therapeutic potential of berberine against neurodegenerative diseases // Sci. Chin. 2015. V. 58. P. 564. https://doi.org/10.1007/s11427-015-4829-0
12. *De Oliveria J.S., Abdalla F.H., Dornelles G.L., Adefegha S.A., Palma T.V., Signor C, Bernardi J. da S., Baldissarelli J., Lenz L.S., Magni L.P., Rubin M.A., Pillat M.M., Andrade C.M.* Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer`s-like dementia: Involment of acetilcholinesterase and cell death // Neurotoxicologe. 2016. V. 57. P. 241. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.10.008
13. *Yuan N.-N., Cai C.-Z., Wu M.-Y., Su H.-X., Lu J.-H.* Neuroprotective effects of berberine in animal models of Alzheimer's disease: a systematic review of pre-clinical studies // BMC Complement Altern Med. 2019. V. 23. P. 109. https://doi.org/10.1186/s12906-019-2510-z
14. *Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А.* Лекарственные растения. М.: Изд-во Высшая школа. 1990. С. 544.
15. *Ikuta A., Itokawa H.* Berberine and other protoberberine alkaloids in callus tissue of *Thalictrum minus* // Phytochem. 1982. V. 21. P. 1419.
16. *Сараев И.В., Величко Н.А., Репях С.М.* Химический состав василистника малого *Thalictrum minus* L. // Химия растительного сырья. 2000. № 1. С. 37.
17. *Бутенко Р.Г.* Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного

происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Изд-во Наука. 1986. С. 3.

18. *Nakagawa K., Fukui H., Tabata M.* Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus* // Plant Cell Rep. 1986. V. 5. P. 69. https://doi.org/10.1007/BF00269722
19. *Hara M., Kitamura T., Fukui H., Tabata M.* Induction of berberine biosynthesis by cytokinins in *Thalictrum minus* cell suspension cultures // Plant Cell Rep. 1993. V. 12. P. 70. https://doi.org/10.1007/BF00241937
20. *Hara M., Morio K., Yazaki K., Tanaka S., Tabata M.* Separation and characterization of cytokinin-inducible (*S*)-tetrahydroberberine oxidases controlling berberine biosynthesis in *Thalictrum minus* cell cultures // Phytochem. 1995. V. 38. P. 89. https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00623
21. *Осипова Е.А.* Агробактериальная трансформация культуры клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2018. Т. 20. С. 447.
22. *Осипова Е.А., Цыбулько Н.С., Шамина З.Б.* Вариабельность клеточных клонов *Thalictrum minus* in vitro // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 908.
23. *Карпун Н.Н., Янушевская Э.Б., Михайлова Е.В.* Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. С. 540. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.540rus
24. *Ramakrishna A., Ravishankar G.A.* Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // Plant Signal Behav. 2011. V. 6. P. 1720. https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613
25. *Siatkaa T., Chlebekb J., Hošťálkováb A.* Copper (II) sulfate stimulates scopoletin production in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* // Nat. Product Commun. 2017. V. 12. P. 1779.
26. *Kartosentono S., Indrayanto G., Zaini N.C.* The uptake of copper ions by cell suspension cultures of Agave amaniensis, and its effect on the growth, amino acids and hecogenin content // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2002. V. 68. P. 287.
27. *Bhuiyan N.H., Adachi T.J.* Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of Portulaca // Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 1117. https://doi.org/10.1078/0176-1617-01044
28. *Томилова С.В., Кочкин Д.В., Галишев Б.А., Носов А.М.* Влияние повышенных Концентраций ионов меди на ростовые характеристики и синтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Tribulus terrestris* L. // Биотехнология. 2019. V. 35. P. 42.
29. *Осипова Е.А.* Влияние биотического стресса на содержание протоберберинoвых алкалоидов в суспензионной культуре клеток *Thalictrum minus* L. Ученые записки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского // Биология. Химия. 2020. Т. 6. С. 125.
30. *Murashige T.* A revised medium for repid growth and bioassays with tobacco tissue cultures Murashige T. and Skoog F // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052
31. *Loeffer S., Zenk M.N.* Hydroxylation step in the biosynthetic pathway leading from norcociaurine to reticuline // Phytochem. 1990. V. 29. P. 3499.
32. *Frenzel T., Zenk M.N.* S-adenosyl-L-methionine: 3′-hydroxy-N-methyl (S)-cjclaurine-4-O-Methiltransferase, a region-and streoselectiveenzyme of the (S)-reticuline pathway // Phytochem. 1990. V. 29. P. 3505.
33. *Staba J.E.* Plant tissue culture as a technique for the phytochemistry Staba J.E. // Resent Adv. In Phytochem. 1969. V. 2. P. 80.
34. *Цыбулько Н.С., Осипова Е.А.* Метод определения протоберберинoвых алкалоидов в культуре ткани василистника // Химико-фармацевтический журнал. 1999. Т. 33. С. 34.
35. *Fang Y., Smith M.A.L., Pépin M.F.* Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*) // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 1999. V. 35. P. 106.
36. *Humberto A.-B.H., Vazques-hemandes M.C., Saenz de la O.D., Alvarorado-Mariana A., Guevara-Gonzales R.G., Garcia-Trejo J.F., Feregrino-perez A.A.* Role of stress and defense in plant secondary metabolites production // Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications. 2020. P. 15.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 417–432

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 581.1

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *Arabidopsis thaliana* В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2023 г. В. А. Фридман[a], *, В. С. Фадеев[a], А. А. Тюрин[a], И. С. Демьянчук[a], И. В. Голденкова-Павлова [a]

[a] *Федеральное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия*

**e-mail: VikaFridman@gmail.com*

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.
После доработки 10.02.2023 г.
Принята к публикации 10.02.2023 г.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh является одним из важнейших модельных организмов в различных областях науки: физиологии и биохимии растений, биологии развития, генетической инженерии, геномном редактировании и в других. Преимущества этих модельных растений: короткий жизненный цикл, простота культивирования, секвенированный и достаточно хорошо аннотированный геном, множество доступных данных о транскриптоме, протеоме, метаболических путях, мутациях. Культивирование *A. thaliana* в лабораторных условиях – важный аспект многих исследований в случае использования этого растения как модели. Выбор способа выращивания зависит от цели исследования, количества и типа необходимого биоматериала. Целью данной работы является обзор методов культивирования растений *A. thaliana* и их применимость для различных исследований.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, гидропоника, культивирование, почва, стерильная культура

DOI: 10.31857/S0015330323600109, **EDN:** QAXRZE

ВВЕДЕНИЕ

Впервые резуховидка (резушка) Таля описана в 1577 г. Иоганном Талем. В 1842 г. Густав Хейнхольд систематизировал растение, которое получило современное название *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *A. thaliana* широко используется в качестве модельного растения во многих лабораториях по ряду причин; (1) возможность выращивания в различных условиях (стерильно в культуре *in vitro*; в оранжерее; в почве или в гидропонной установке); (2) возможность самоопыления; (3) короткий жизненный цикл; (4) небольшой и хорошо аннотированный геном; (5) восприимчивость к культуре тканей; (6) большой выбор экотипов и мутантных линий (как природного происхождения, так и целенаправленно полученных); (7) простые методы генетической трансформации и геномного редактирования [1–4].

Согласно современным литературным данным самыми распространенными субстратами для культивирования растений *A. thaliana* являются агаризованные питательные среды (чаще всего МС [5] и ее модификации [6–27]), почва и почвенные смеси (коммерчески доступные готовые смеси; компостные смеси; смеси почвы с песком, вермикулитом, керамзитом, суглинком в различных соотношениях) [13, 28–37] и гидропоника с различными модификациями и дополнениями [35, 38–62]. Выбор метода выращивания из имеющегося арсенала для решения ряда научных задач крайне актуален и обуславливает успешное проведение исследования. Отметим, что *A. thaliana* – миниатюрное розеточное растение, не требует большой площади для выращивания. В то же время именно малый размер и уязвимость при росте и пересадке из одних условий выращивания в другие представляет значимую проблему для ряда исследований.

В данном обзоре мы рассмотрим и сравним основные способы культивирования модельного растения *A. thaliana*: в стерильной культуре *in vitro*, в почве и смесях и в гидропонных условиях. Для каждого метода выращивания будут описаны особенности его использования и данные, которые получают с его помощью; возможность модификации условий, которые можно применить в процессе культивирования растений; а также преимущества и ограничения метода для различных направлений исследования.

1. СТЕРИЛЬНАЯ КУЛЬТУРА РАСТЕНИЙ *A. THALIANA IN VITRO*

1.1. Этапы подготовки и выращивания растений

Для этого метода культивирования семена подвергают стратификации, стерилизации, и за-

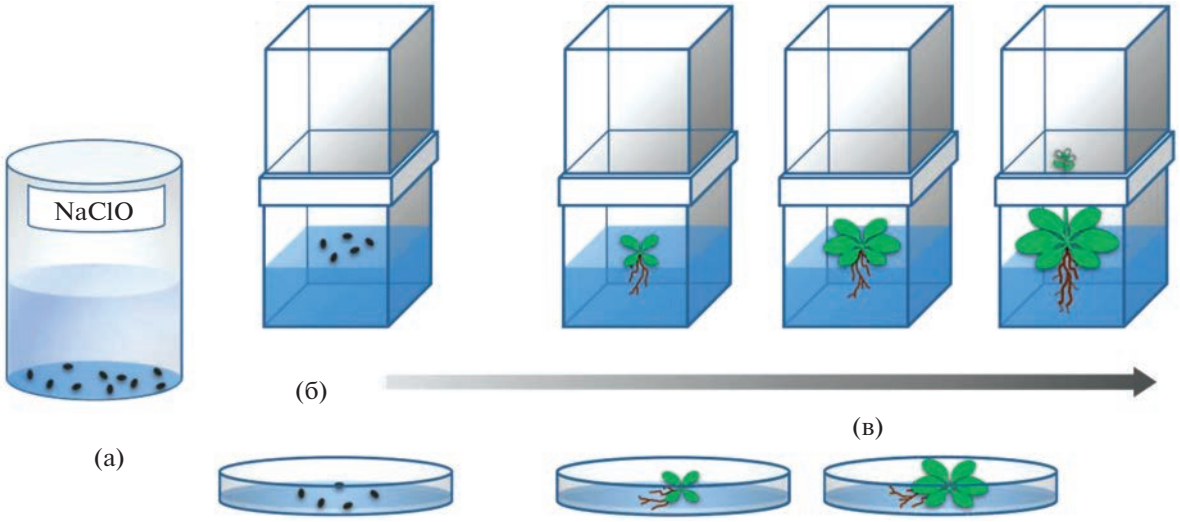


Рис. 1. Культивирование в стерильных условиях *in vitro*: в стерильных условиях *A. thaliana* культивируют в чашках Петри или контейнерах. (а) – стерилизация семян; (б) – посадка на агаризованную питательную среду с последующей стратификацией; (в) – развитие растений. На рисунке изображено одно растение в одной емкости; есть возможность выращивания большего количества растений в каждой емкости, в зависимости от необходимого возраста биоматериала.

тем высаживают на поверхность агаризованной среды в чашках Петри или других емкостях (рис. 1).

1.1.1. Стратификация семян

Прорастание семян и оптимальное развитие растения требуют точной координации множества внутренних процессов. С помощью стратификации моделируют воздействие холода, происходящее в природе в зимний период. Стратификация позволяет ускорить прорастание семян и повысить их всхожесть за счет воздействия на экспрессию генов путей биосинтеза, катаболизма и передачи сигналов фитогормонов, в частности, гиббереллловой кислоты [63] и абсцизовой кислоты [64]. Для одновременного прорастания и эффективного развития растений *A. thaliana* требуется 72 ч холода (~2–4°C) и темноты в сочетании с высокой влажностью [65]. При исключении этапа стратификации в зависимости от возраста семян после сбора и условий хранения прорастание может происходить неравномерно, что приведет к неоднородности растительного материала и, в конечном итоге, может повлечь за собой негативные последствия для эксперимента и интерпретации полученных результатов. Методика проведения стратификации проста и эффективна, рекомендуется ее обязательное использование для снижения влияния качества семян на получаемый растительный материал.

1.1.2. Стерилизация семян

Выращивание на агаризованных питательных средах требует применения стерилизации семян, поскольку состав сред подбирается таким, чтобы он был благоприятным для растений; что, как правило, делает его подходящим также для различных микроорганизмов с поверхности семян, из воздуха, с инструментов и рук исследователя.

Влияние стерилизации на семена *A. thaliana* в литературе описывают очень кратко. В каждой лаборатории приняты свои методы, которые в публикациях только упоминают. Важным при стерилизации семян является подбор такого режима, который позволит уничтожить контаминирующие микроорганизмы, при этом существенно не повредив семена и не оказав влияния на рост растений.

При анализе литературных источников было выделено три наиболее распространенных метода стерилизации семян *A. thaliana*: 1) с использованием растворов хлорсодержащих отбеливателей; 2) с использованием этанола; 3) с применением газообразного хлора.

Для многих видов растений, культивируемых *in vitro*, наиболее часто используется стерилизация с помощью хлорсодержащих отбеливателей [6]. Семена замачивают в стерилизующем растворе определенной концентрации в течение некоторого времени экспозиции, после чего тщательно отмывают стерильной водой. Оптимальная концентрация и время воздействия стерилизующего агента различаются в зависимости от морфологии семян: их размера и формы, поверхности, наличия каких-либо образований. В эксперименте показано, что для *A. thaliana* экотипа Col-0 стерилизация отбеливателем в течение 5–10 мин в концентрации 40–100% не оказывает

значимого влияния на всхожесть семян. Высокие показатели прорастания семян отмечены и при концентрации бытового отбеливателя 40% и 50% для всех временных интервалов стерилизации. Обработка 80–100% отбеливателем в течение более 10 мин приводит к снижению всхожести; отмечается обесцвечивание и сморщивание поверхности семян. Кроме того, у проростков выживших после такой обработки семян с большой частотой выявлены дефекты семядолей, деформации гипокотиля. На основе имеющихся данных определен оптимальный режим стерилизации: концентрация отбеливателя 50% с экспозицией 10 мин [6].

Еще одним распространенным методом стерилизации семян является замачивание в этиловом спирте. Поскольку семена *A. thaliana* имеют небольшой размер, их выдерживают в 70–100% спирте от 1 до 20 мин с последующим промыванием стерильной водой [7]. Иногда к этанолу добавляют Triton X-100 в качестве детергента [8–10] или другие вещества: например, хлорид бария [11], перекись водорода [12].

Применяется и совмещение двух названных выше методов: семена сперва замачивают в спирте, а затем в отбеливателе, или наоборот [13–18].

Для стерилизации семян *A. thaliana* используют также газообразный хлор. В основе метода лежит реакция между хлорсодержащим отбеливателем и концентрированной соляной кислотой с выделением газообразного Cl_2, а также хлорида натрия и воды в качестве побочных продуктов. Заранее рассчитывают количество реагентов для достижения определенной концентрации газообразного хлора в заданном объеме контейнера, смешивают их в отдельной емкости и помещают семена в тот же контейнер, что и сосуд, из которого выделяется Cl_2. При использовании данного метода показано, что значительное влияние на всхожесть семян оказывает не концентрация газообразного хлора, а время экспозиции. Экспериментально установлено, что обработка в течение трех часов газообразным Cl_2 в концентрации выше 16.5% значительно снижает всхожесть семян. Эффективное подавление развития микроорганизмов при сохранении хорошей всхожести (более 82%) наблюдается при обработке Cl_2 в концентрации от 6.1% до 16.5% в течение 1 ч, а также более низкими концентрациями (от 2.1%) в течение 3 ч [6].

Стерилизация отбеливателем рекомендуется для линий с более низким потенциалом прорастания (20–70%): показано, что стерилизация газообразным хлором оказывает несколько большее негативное влияние на всхожесть [6]. Если необходимо провести стерилизацию одновременно большого количества семян, целесообразно применить газовую стерилизацию. Не рекомендуется применять эти два метода для семян с эффективностью прорастания менее 20%, поскольку в этом случае всхожесть может снизиться очень существенно.

1.1.3. Посадка семян на агаризованную среду

После подготовки семена высаживают на застывшую агаризованную питательную среду. Поскольку семена *A. thaliana* имеют небольшой размер, можно ресуспендировать их в небольшом количестве стерильной воды и распределить по поверхности среды. На этом этапе необходимо соблюдать стерильность: все операции от стерилизации семян включительно проводят в ламинар-боксе, поскольку есть риск контаминации питательной среды микроорганизмами.

1.2. Биологический материал и его использование

Растения, выращенные на агаризованных питательных средах, используют в различных направлениях исследований, поскольку имеется возможность получать компоненты растительных клеток из различных частей проростков и исследовать качественный и количественный состав целевых веществ (например, таких, как нитраты, углерод, сахара, хлорофилл, иные вторичные метаболиты, транскрипты, аминокислоты и др.). Растения, выращенные в этих условиях, могут быть использованы для оценки ростовых показателей: биомассы побегов, корней и их соотношения [19], скорости прорастания семян и времени появления первых листьев [20]. Агаризованные среды также используют для проращивания семян перед пересадкой в почву.

Ниже мы приводим ряд примеров исследований, в которых использованы растения *A. thaliana*, выращенные на агаризованных средах *in vitro*.

1.2.1. Исследование корневой системы

Для оценки развития корневой системы чашки располагают вертикально, и корень за счет положительного геотропизма растет параллельно поверхности среды [11, 13, 19–21]. При таком выращивании легко можно подсчитать количество первичных корней проростков, измерить их длину, а с использованием определенного программного обеспечения предсказать биомассу растений [20]. Кроме того, Lotier с соавт. [11] провели исследование, в котором при таком культивировании предварительно оценивали уровень экспрессии гена глутаминсинтетазы GLN1;2, связанного с геном глюкуронидазы *uid*A, путем GUS-окрашивания проростков и микроскопии: сравнивали экспрессию целевого гена у растений, выращенных на средах с разными источниками азота. *A. thaliana*, выращенный на среде с аммонием, окрашивается интенсивнее, чем на среде с нитра-

тами, что говорит о более высоком уровне экспрессии целевого гена в первом варианте.

1.2.2. Отбор трансформантов

На агаризованной среде можно легко отбирать трансформированные растения. Ariyarathne и Wone трансформировали *A. thaliana*, экспрессирующий ген с оптимизированным кодоновым составом, который кодирует фактор транскрипции bHLH из *Selaginella lepidophylla* – засухоустойчивого колючего мха, способного переносить потерю до 96% клеточной воды. Экспрессионный вектор содержит ген устойчивости к канамицину, что позволяет отобрать трансгенные растения [20]. В исследовании Han с соавт. такую селекцию проводили с использованием гигромицина: трансгенные растения *A. thaliana* получали с использованием вектора, несущего ген устойчивости к этому антибиотику, а целевым выступал ген фактора транскрипции *PdNF-YB7* из тополя, экспрессия которого привела к повышению эффективности использования воды растениями [13].

1.2.3. Исследование всхожести семян

На чашках с агаризованной средой удобно оценивать всхожесть семян [20, 22]. Поскольку для определения этого параметра нет необходимости получения взрослых растений, агаризованная среда является оптимальным вариантом: не требуется значительных материальных и временных затрат. На одной чашке можно высадить большое количество семян, что позволит получить выборку, достаточную для статистического анализа. Такой метод позволяет провести сравнительный анализ семян, предположительно различающихся по всхожести, а также исследовать влияние различных факторов и веществ на всхожесть.

1.3. Модификации условий и их вклад в результаты исследований

При выращивании растений с использованием агаризованных питательных сред имеется возможность точно контролировать их состав. Например, варьировать источник и количество азота [11, 19], моделировать воздействие солевого стресса различной интенсивности на прорастание семян или на молодые растения [20], подвергать растения обезвоживанию добавлением осмолитиков [20].

Кроме состава самой среды, можно модифицировать и внешние условия. Так, Tholen с соавт. [23] исследовали чувствительность растений *A. thaliana* к повышенному содержанию этилена в воздухе. Для этого открытые чашки Петри с семенами на агаризованной МС-среде помещали в эксикаторы и выращивали в условиях насыщающей концентрации этилена в течение трех суток, после чего измеряли длину первичного корня и гипокотиля. В рамках того же исследования рассматривали выделение этилена растениями в герметично закрытых чашках Петри. После 14 дней выращивания из чашек отбирали пробы газа и пересчитывали объем выделенного газа на единицу площади листьев проростков.

Воздухообмен является одним из важных факторов для жизни растения. Matuszkiewicz с соавт. [24] провели сравнительное исследование роста *A. thaliana* в чашках Петри, запечатанных герметично с помощью парафилма (“Parafilm”, США) и с помощью воздухопроницаемой медицинской ленты (3M “Micropore”, США). Растения выращивали на одинаковой питательной среде Кнопа и сравнивали скорость роста и структуру корневой системы, утечку ионов, эффективность фотосинтеза, выработку этилена и накопление углекислого газа, а также маркеры окислительно-восстановительного статуса и сигналинга салицилата, жасмоната и этилена с помощью количественной ПЦР. Проведенное исследование позволило убедительно продемонстрировать, что отсутствие аэрации вызывает у растений стрессовые реакции, которые могут в ходе какого-либо исследования повлиять на фенотип и другие признаки, и, тем самым, исказить интерпретацию результатов.

В 2017 г. Basu с соавт. [25] провели исследование, направленное на выявление влияния аппаратуры Biological Research in Canisters – Petri Dish Fixation Units (BRIC-PDFU, США) на проростки *A. thaliana*; в частности, на транскриптом и протеом. Это оборудование применяется для изучения растений, микроорганизмов и их взаимодействий в чашках Петри в космосе. BRIC-PDFU представляет собой прямоугольный блок, вмещающий 6 устройств с зафиксированными чашками Петри, с возможностью контроля температуры и газообмена, а также подачи жидкости (например, воды, фиксатора, питательного раствора) в чашки. Проведено сравнение трехдневных растений, культивируемых на Земле в одинаковых условиях, с использованием оборудования и без него в герметичном контейнере. После трех дней роста в чашках с агаризованной ½ МС-средой проростки обрабатывали стабилизатором РНК и замораживали при –80°C для имитации экспериментальных условий на МКС. Далее материал размораживали, выделяли РНК и белки и анализировали. Выявлено более 1600 генов, дифференциально экспрессируемых в зависимости от использования BRIC-PDFU; показаны различия в почти 1200 растворимых и мембранных белках; причем по результатам GO-анализа эти гены и белки оказались связаны с реакциями на абиотический стресс. Также масс-спектрометрия выявила различия в фосфорилировании 8 белков. В целом

данные показывают, что используемое оборудование влияет на результаты экспериментов.

В исследовании Ryu с соавт. [26] изучали роль летучих веществ ризобактерий, стимулирующих рост растений (PGPR) (*Pseudomonas fluorescens* 89B-61, *Bacillus pumilus* T4, *B. pasteurii* C-9, *B. subtilis* GB03, *B. amyloliquefaciens* IN937a, *Serratia marcescens* 90–166, *Enterobacter cloacae* JM22). Для этого растения проращивали на чашках Петри с ½ МС-средой и через 2 дня пересаживали на чашки с перегородкой в середине (I plates, “Fisher Scientific”, США). На одной стороне культивировали растения *A. thaliana*, а на другой – один из семи исследуемых штаммов ризобактерий. Бактерии с растениями культивировали в течение двух недель, при этом благодаря использованию специфических чашек Петри они физически не контактировали между собой, а только посредством летучих веществ. Для этой же цели можно культивировать растения в чашках с бумажными дисками, смоченными экстрактами летучих веществ, выделяемых рассматриваемыми бактериями. Рост растений анализировали с помощью системы анализа видео “AgVsion” (США).

В другом исследовании [27] оценивали влияние летучих веществ, выделяемых бактериями (*Bacillus subtilis*), на рост растений *A. thaliana*, но в более взрослом возрасте. Использовали контейнеры “Magenta” (США) с ½ МС-средой. *A. thaliana* выращивали до различного возраста, максимально – 12 недель, до получения семян. В отдельный стеклянный сосуд внутри контейнеров помещали суспензионную культуру бактерий (или воду в контрольном варианте), которую меняли каждые 4 недели. Таким образом обеспечивали контакт растений с летучими веществами, выделяемыми бактериями, но не с самими бактериями. Воздухообмен осуществляли через отверстия в верхней части контейнера, одновременно отбирали через адсорбент летучие вещества со скоростью 0.5 л/мин. Влияние выделений бактерий определяли, измеряя в листьях растений содержание хлорофилла (спектрофотометрически в ацетоновых экстрактах листьев) и количество железа (в растертых в жидком азоте тканях листа); также анализировали время цветения и количество розеточных листьев, их сырую и сухую массу; количество, массу и скорость прорастания семян. Таким образом, было продемонстрировано долгосрочное стимулирование роста растений *A. thaliana* при длительном воздействии летучих выбросов *Bacillus subtilis* (GB03), что проявляется в увеличенных массе корней и количестве розеток, и, как следствие, сырой и сухой массе. Наблюдается также задержка цветения, при этом количество семян как репродуктивный показатель растений значительно увеличилось по сравнению с контролем.

1.4. Преимущества

Преимуществом метода можно назвать его простоту: посадка растений не вызывает сложностей, и растения после нее не нуждаются в дополнительной обработке.

Контролируемые условия культивирования – также важная положительная сторона метода. Помимо простоты манипулирования составом среды, чашки Петри имеют небольшой размер, и растения в этих условиях роста достаточно легко можно подвергать воздействию различных внешних факторов: например, различной освещенности и температуре.

Следует отметить, что для некоторых экспериментов бывает необходимо получать стерильный материал, что затруднительно или вовсе невозможно при других способах выращивания. Поэтому стерильные условия можно также назвать преимуществом метода культивирования на агаризованных питательных средах, несмотря на то, что поддержание таких условий несколько усложняет метод и требует дополнительных материальных затрат.

1.5. Ограничения

Важное ограничение культивирования *A. thaliana* в чашках Петри заключается в том, что невозможно вырастить взрослые растения. Через 12–14 дней проростки упираются в крышку чашки, а корни – в ее дно. Это не является препятствием, если для целей исследования требуются растения до достижения этого возраста.

Частично эта проблема решается выбором емкости большего объема – например, контейнеров. В этом случае рост растения также ограничен, однако, его может быть достаточно для целей эксперимента. Возникает необходимость оптимизации состава среды, чтобы питательные вещества не истощились за время культивирования.

Необходимость стерилизации семян, среды, емкостей, а также проведение манипуляций в стерильных условиях может являться ограничивающим фактором: требуется специальное оборудование и сотрудники, обученные с ним работать. Манипуляции, связанные с обеспечением стерильности и ее поддержанием, усложняют и удорожают методику выращивания.

2. ПОЧВА

2.1. Описание метода

Почва – один из наиболее простых способов культивирования растений. Семена либо сразу высаживают в почву, либо проращивают на агаризованной питательной среде, и затем пересаживают в почву. Существует множество модификаций субстратов, как коммерчески доступных, так и приготавливаемых исследователями самосто-

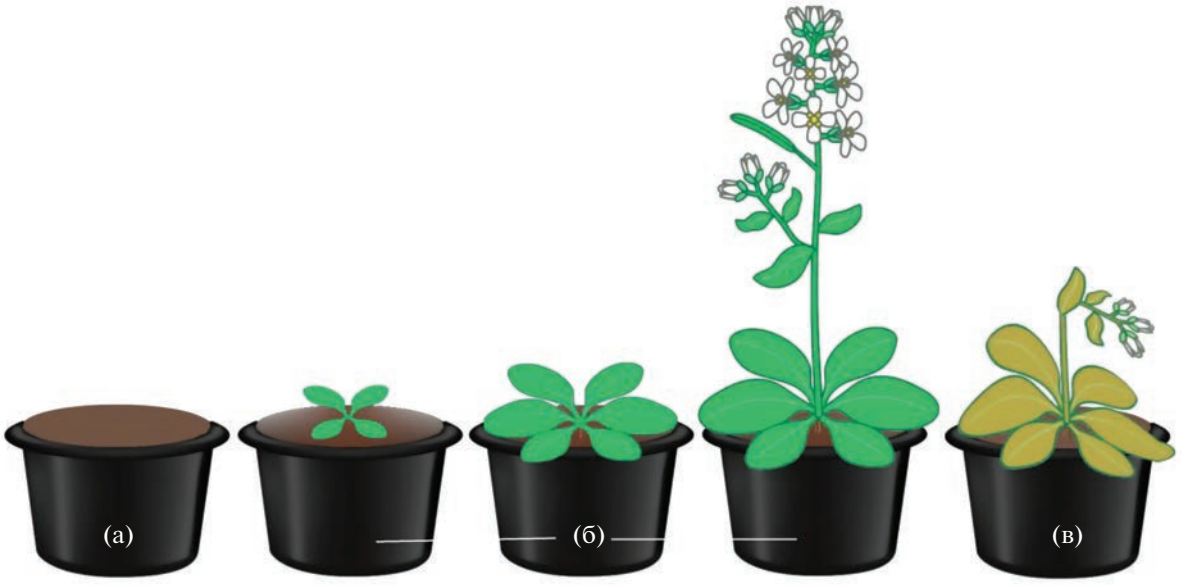


Рис. 2. Выращивание растений *A. thaliana* на почве и почвенных смесях: (а) – посадка семян в почву с последующей стратификацией (опционально в зависимости от требований к получаемому биоматериалу); (б) – развитие растений; (в) – увядание растений, получение зрелых семян.

ятельно: смеси почвы с песком, вермикулитом, суглинком, компостом в различных соотношениях, а также беспочвенные субстраты и смеси. Растения на таких субстратах, как правило, выращивают нестерильно, осуществляя полив водой или питательными растворами (рис. 2).

2.2. Биологический материал и его использование

В почве можно выращивать *A. thaliana* до различных стадий развития, вплоть до получения семян и увядания, поскольку растения не ограничены в пространстве.

2.2.1. Биохимические и физиологические исследования

Выращенные в почве растения или полученные из них ткани можно использовать для оценки фенотипа надземной части (биомассы и размеров растений и отдельных частей [28], калориметрического выхода после сушки или сжигания тканей [29], числа и массы семян [30–33]), динамики роста и развития растений [30, 32, 33], для биохимических и молекулярных исследований (суммарный белок, хлорофилл, сахара, крахмал, нитраты, аминокислоты, активность некоторых ферментов [30]). Могут быть получены в достаточном для исследований количестве выделения растений: например, выделяют ксилемный сок для измерения концентрации в нем АБК [34], экссудаты флоэмы для определения аминокислот, транспортируемых по этой ткани [11]. При выращивании растений до взрослого состояния можно получать наибольший выход биомассы для различных экспериментов. Можно легко разделять растения на компартменты (листья различных уровней, цветок, стручки, семена и т.д. [35]) и исследовать их по отдельности (например, дифференциальную экспрессию интересующих генов, различия в накоплении вторичных метаболитов и других веществ).

На растениях, выращенных в почве, исследуют различные физиологические процессы: эффективность фотосинтеза [31], параметры газообмена, скорость ассимиляции углерода [29], эффективность использования воды [20, 29], водный потенциал растений [34]; проводят изотопный анализ тканей [29].

2.2.2. Трансформация растений

Некоторые методы трансформации растений, в том числе и для геномного редактирования, требуют использования взрослых растений. Например, для метода погружения цветков необходимо получение цветущих растений, генетически трансформированные семена которых будут получены за счет погружения цветков в суспензию агробактерий [13, 36]. После созревания семена собирают, при необходимости стерилизуют, если это требуется для дальнейших экспериментов.

2.2.3. Исследование мутантных линий

Существует проект unPAK (Undergraduate Phenotyping of Arabidopsis Knockouts) [32], который позволил получить данные о фенотипе для тысяч линий инсерционных мутантов *A. thaliana*. Цель проекта – поиск отражения генотипа в конкретных фенотипических признаках. Семена мутантов *A. thaliana* Colambia с нокаутом одного гена из коллекции института Солка (Salk Institute, США) были разосланы в лаборатории по всему миру для получения данных о фенотипических изменениях, происходящих в результате конкретных мутаций. Поскольку не все мутантные фенотипы могут проявляться в стандартных условиях выращивания, рассматривали также и некоторые стрессовые условия: температура, соленость почвы, конкуренция (посадка в один горшок определенного объема одного, трех или пяти растений), концентрация питательных веществ и длина светового дня. Для исключения влияния различных факторов, зависящих от конкретной лаборатории, в качестве контроля были выбраны 11 линий *A. thaliana* (в том числе немутантная линия Col-0), которые использовали для сравнительного анализа в каждом эксперименте наряду с интересующими мутантными растениями. Исследование охватывает примерно треть генома *A. thaliana* (около 9000 генов). Растения выращивали на коммерчески доступной горшечной среде ProMix BX (Канада) по единому протоколу, анализировали фенотип на 5 и 8 неделе после прорастания с последующим включением полученных данных в общую базу. Благодаря проекту unPAK получена информация о фенотипе множества линий в большом числе повторностей, что позволяет говорить о статистической достоверности полученных результатов и делать выводы о влиянии конкретных мутаций на фенотип.

2.3. Модификации условий и их вклад в результаты исследований

При использовании почвы в качестве субстрата модификации состава среды исследовать непросто, учитывая сложные взаимодействия химических элементов с ее частицами. Проведены исследования по поиску оптимального твердого субстрата, например, в контексте сокращения объемов использования торфа для лабораторного выращивания. Так, Drake с соавт. [31] сравнили характеристики растений *A. thaliana*, выращенных на различных бесторфяных средах (кокосовое волокно, домашний и древесный компост) с таковыми, выращенными на среде с торфом. Семена Col-0 и *Ler* культивировали 14 дней на агаризованной ½ МС-среде, затем переносили в лотки с исследуемым субстратом с одинаковым количеством воды. Далее оценивали приживаемость рассады, площадь листьев на стадии розетки, сухую биомассу воздушной части при стрелковании, время цветения, эффективность фотосинтеза, выход семян и их жизнеспособность.

Авторы пришли к выводу, что *A. thaliana* на бесторфяных средах растет хуже: кокосовое волокно само по себе не подходит из-за его механической структуры и дефицита нитратов; домашний компост из пищевых и садовых отходов дает менее стабильные результаты, чем торф, но может быть использован в качестве частичной его замены в компостных смесях; компост на основе древесного волокна во многом так же пригоден, как торф, но в рамках эксперимента отмечена непостоянная семенная продуктивность и уязвимость для грибков, особенно после автоклавирования. В целом авторы делают вывод о возможности частичной замены торфа в смесях для выращивания в комбинации с оптимизацией условий культивирования.

При выращивании растений в почве имеется возможность моделировать условия засухи: для этого необходимо проводить взвешивание горшков, и соблюдать точные соотношения воды и почвы [13]. Помимо этого, необходимо учитывать прирост биомассы растений, испарение воды с поверхности почвы (а не только потребление ее растениями). Эти процедуры проводят вручную, что достаточно трудоемко и требует большого количества времени и/или рабочих рук, а также ограничивает количество растений, которые можно использовать для эксперимента. Для упрощения исследований в этом направлении разработана автоматизированная система Phenopsis (“Apilogic”, Франция) для фенотипирования растений *A. thaliana* в условиях водного дефицита [34]. Применение этой системы позволяет взвешивать, поливать и фотографировать каждое отдельное растение. Основные этапы таких исследований включают высев семян в горшки со смесью суглинка и органического компоста, проращивание и прореживание до одного растения на горшок, после чего горшки помещают в ячейки автоматизированной системы. Phenopsis регулярно фотографирует каждое растение, взвешивает, доводит почву до состояния заданной влажности с поправкой на вес растения. Для внесения этой поправки еженедельно по три растения с каждой опытной и контрольной группы отбирают и взвешивают. Phenopsis применяют для изучения реакции растений на засуху и обнаружения локусов количественных признаков, связанных с этой реакцией [28].

В работе Guo с соавт. [37] изучали влияние плотности посева растений *A. thaliana* на их морфологию и продуктивность. Использовали одинаковые горшки с одинаковым количеством почвы и поливом, но высаживали в них разное количество растений: расстояние между ними варьировали от 2 до 10 см. В возрасте трех недель исследовали

листья растений: измеряли угол наклона и их размер, выделяли РНК для секвенирования тотального транскриптома и количественной ПЦР. Из всех экспериментов исключали растения, расположенные на краю горшков. Было показано, что загущение посадки влияет как на фенотип, так и экспрессию ряда генов, однако не вызывает у растений стрессовой реакции.

2.4. Преимущества

В почве можно выращивать растения *A. thaliana* до любого возраста, вплоть до увядания. Это дает возможность получения семян, изучения стареющих растений.

Важным достоинством культивирования в почве и почвенных субстратах является простота и небольшие материальные затраты.

Следует подчеркнуть, что отсутствие стерильности при выращивании растений в почве можно трактовать и как преимущество, и как недостаток. Так, эксперименты по стерилизации субстратов для выращивания путем автоклавирования [31] показали, что почва и компостные смеси после этой процедуры становятся более подвержены заражению плесенью, поскольку уничтожается собственная микрофлора субстрата и, соответственно, исчезает конкуренция для грибков, обитающих в нестерильных помещениях, в которых обычно выращивают растения.

2.5. Ограничения

Важным недостатком выращивания растений в почве является сложность анализа корневой системы. При культивировании на любом сыпучем материале для получения корня его необходимо извлечь из субстрата и очистить от его остатков, что часто вызывает определенные сложности. Кроме того, есть риск повреждения корней. Если требуется корень как биоматериал, например, для анализа содержания каких-либо веществ, то существует вероятность контаминации биоматериала частицами субстрата или микроорганизмами почвы.

При использовании метода выращивания растений в почве следует учитывать, что в ней всегда содержится биоценоз микроорганизмов, уничтожение которого может приводить к заражению выращиваемых в ней растений патогенами, не встречающими в стерилизованной почве конкуренции [31]. Это накладывает на исследователя дополнительную ответственность в отношении соблюдения чистоты и разграничения пространства для выращивания растений в почве и других экспериментов, для которых контаминация микроорганизмами почвы нежелательна.

3. ГИДРОПОНИКА

3.1. Этапы подготовки и выращивания растений

Термин “гидропоника”, который происходит от слияния древнегреческих слов “вода” и “работа”, впервые сформулировал фитофизиолог Уильям Ф. Геррике в 1929 г. Изначально под этим термином подразумевалась методика выращивания растений с использованием жидких питательных сред без применения почвы [38]. Определение гидропоники с годами расширилось и стало синонимично беспочвенной культуре, которая включает выращивание растений в любом инертном субстрате, жидком_или твердом (песок, гравий, вермикулит, перлит, минеральная вата) [35, 39, 40].

Проращивают семена на твердом субстрате, служащем механической опорой для растения (агаризованная среда [41, 42], минеральная вата [43, 44], песок [35, 40], вермикулит [39]). Для синхронизации прорастания, как правило, также применяют стратификацию.

Далее в зависимости от выбранного способа культивирования молодые растения либо продолжают выращивать на том же субстрате, осуществляя полив питательным раствором (МС, Хогланда, Кнопа и др.) [39, 41, 43, 44, 66]; либо переносят в гидропонную установку, которая обеспечивает постоянное или периодическое смачивание корней питательным раствором (рис. 3).

Например, Robison с соавт. [42] проращивали семена на чашках Петри с агаризованной питательной средой, а затем пересаживали по одному проростку на один из торцов столбиков минеральной ваты; второй торец погружали в жидкий питательный раствор. Таким образом, как отмечают авторы, достигается практически 100% выживаемость семян. Малая площадь поверхности торца столбика и затемнение в зоне корней решает вопрос контаминации водорослями. Но при таком выращивании невозможно наблюдать и отделить корневую систему растений для дальнейших манипуляций.

Для решения этой проблемы другая группа [41] предложила подход к гидропонному выращиванию *A. thaliana* с использованием распространенного доступного оборудования: контейнеров, пробирок типа “Falcon” и “Eppendorf”. Семена высаживали на агаризованную среду, залитую куполом в крышечки от микроцентрифужных пробирок объемом 1.5 мл с просверленными в центре отверстиями. Крышечки с семенами помещали в контейнер так, чтобы купол агаризованной среды касался жидкой среды. Семена стратифицировали, затем выращивали в климатической камере до возраста 21 день после прорастания. Для активации работы устьиц на 14 день крышки контейнеров приоткрывали, на 17 день снимали. Далее растения пересаживали в контейнеры с аэрацией.

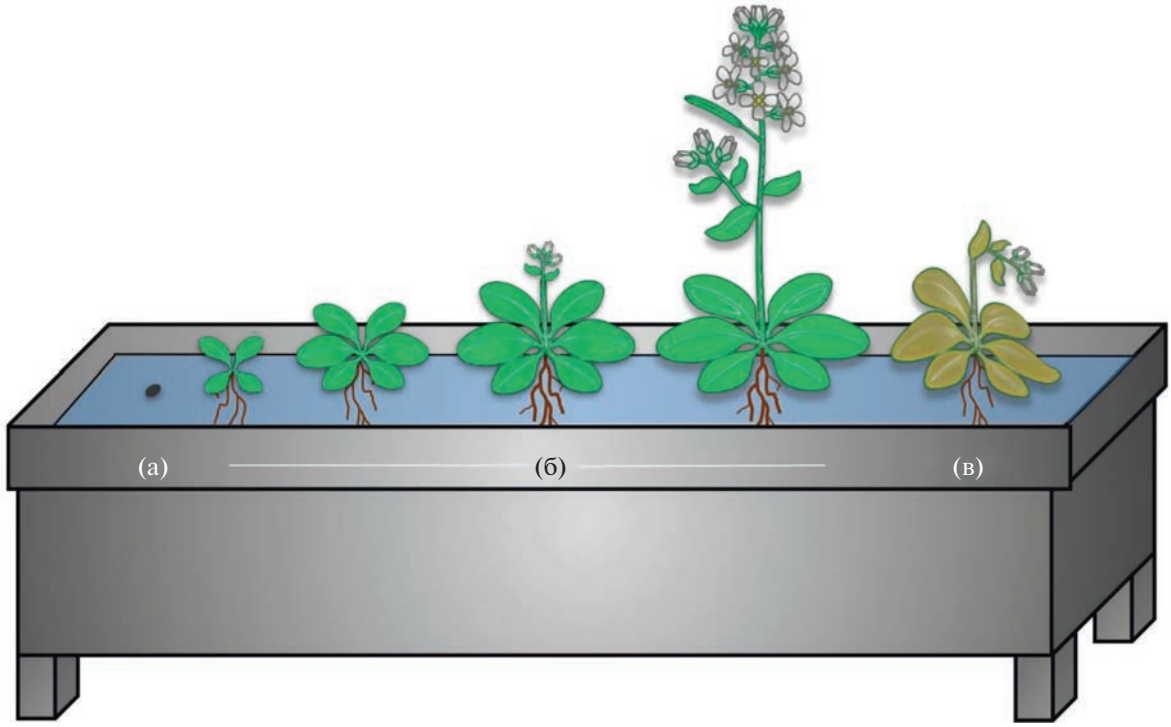


Рис. 3. Гидропонное выращивание растений *A. thaliana*: (а) – посадка семян на субстрат с последующей стратификацией; (б) – развитие растений; (в) – увядание растений, получение зрелых семян.

Для этого у пробирок типа “Falcon” объемом 50 мл обрезали скошенные концы, в крышках проделывали отверстия, соответствующие диаметру крышечек от микроцентрифужных пробирок. Крышечки вместе с растениями помещали в крышки фалконов, которые погружали в среду. При переносе в емкость большего размера, таким образом, существенно снижается вероятность повреждения корней, поскольку их не извлекают из твердого субстрата. В таком состоянии растения выращивали до максимального возраста 7 недель, при этом корни не спутывались между собой и легко могли быть отделены для измерений и дальнейших манипуляций.

Другие исследователи [45] проращивали семена на агаризованной МС-среде, затем в 10-дневном возрасте пересаживали их на смесь песка и перлита и поливали раствором для гидропоники. После выращивания растений таким образом еще 10–12 дней, их пересаживали на гидропонику, предварительно промыв корни от частиц песка и перлита гидропонным раствором. В гидропонном резервуаре растения выращивали до возраста 35 дней, после чего собирали биоматериал, промывали водой и высушивали для дальнейших исследований.

В исследовании Hermans и Verbruggen [46] растения *A. thaliana* проращивали в компосте на основе торфа две недели, после чего промывали корни водой и перемещали в гидропонные контейнеры, в которых моделировали условия дефицита магния.

Как уже упоминалось выше, гидропоникой считается выращивание растений на инертных субстратах, например, на песке. Для этих целей можно использовать кварцевый песок, речной песок (его просеивают через сито для получения частиц желаемого размера [47]). На песке возможно стерильное выращивание: достаточно провести автоклавирование. Отмывка корневой системы от песка не так трудоемка, как от почвы или агара. В то же время, в песке, ввиду отсутствия его структурированности, растения могут развиваться медленно.

Исходя из вышесказанного можно сделать вывод о многообразии способов культивирования в условиях гидропоники. В каждой лаборатории это делают исходя из имеющихся материалов, оборудования и умений.

3.2. Биологический материал и его использование

Выращивая растения *A. thaliana* в условиях гидропоники, можно получать все материалы и данные, что и при использовании двух предыдущих рассмотренных методов; вдобавок есть возможность изучать корневую систему растений.

Ниже приведены несколько примеров, в которых показаны преимущества гидропонного выращивания по сравнению с другими методами.

3.2.1. Исследования с использованием протопластов

Из растений, выращенных гидропонным способом, изолируют протопласты. При доступности корневой системы можно выделять протопласты корневых волосков [48]. Yoo с соавт. [49] представили методику транзиентной экспрессии генов в изолированных протопластах клеток мезофилла *A. thaliana*. Оценивали экспрессию цитозольного sGFP в протопластах, выделенных из растений, выращенных в почве и на гидропонике. Трансфекцию проводили двумя векторами (размером 4 и 12 т.п.н.), после чего определяли количество GFP-позитивных клеток. Эффективность трансфекции протопластов, полученных из листьев растений, выращенных на гидропонике, была выше, чем у таковых из растений, выращенных в почве: в 2 раза для вектора 12 т.п.н. и на 8–26% для вектора 4 т.п.н.

Скорость роста растений, выращенных на гидропонике, в данном эксперименте была на 14–20% выше, чем в почве. При этом не выявлено достоверной разницы ни в размере протопластов, ни во внутриклеточной локализации белка sGFP между растениями, выращенными разными способами. Общий выход протопластов из мезофилла листьев растений, выращенных в условиях гидропоники, на 15% превысил таковой для выращенных в почве; предположительно это обусловлено равномерным ростом, позволяющим собирать здоровые листья на всех этапах развития растений. Таким образом, сочетание высокой скорости роста на гидропонике и эффективности трансформации предоставляет оптимальный биоматериал для изучения физиологических процессов в протопластах растений [49].

3.2.2. Отбор трансгенных растений

При создании трансгенных растений как классическим методом, так и методом геномного редактирования, часто применяют селективный отбор на агаризованных средах или на почве с добавлением антибиотика (фосфинотрицин, канамицин, гигромицин), ген устойчивости к которому переносят в геном в составе вектора, используемого для трансформации. После отбора, как правило, проростки пересаживают в почву, где выращивают до достижения необходимого для эксперимента возраста.

Проблемой этого метода является потенциальное повреждение корневой системы при пересадке, что влияет на выживаемость молодых растений. Гидропонную систему можно использовать как альтернативу почве для выращивания трансформантов, отобранных на чашке с агаризованной питательной средой. Применение данного метода обеспечивает выживаемость более 95% трансформантов, собранные с таких растений семена показывают высокую всхожесть [50].

3.2.3. Измерение газообмена растений

Эксперименты, связанные с измерением газообмена у *A. thaliana*, могут встречать такое препятствие, как небольшой размер растения. Листья *A. thaliana*, выращенные на гидропонике, по сравнению с листьями растений, выращенных в почве, достаточно чистые, поэтому не нуждаются в дополнительной очистке перед измерением газообмена, что позволяет избежать механического повреждения листьев, которое может повлиять на поток воздуха и протяженность пограничного слоя и без того маленькой листовой пластины, и, в свою очередь, может изменить результаты измерений газообмена [41].

3.2.4. Изотопное мечение

Выращивая растения *A. thaliana* на песке, применяют такой метод, как изотопное мечение. Семена высаживают на песок и поливают питательным раствором. Далее в определенном возрасте (40 и 42 дня, во время экспоненциального роста розеток [35, 40]) ^{14}N в составе раствора для полива частично заменяют на изотоп ^{15}N, затем песок с корнями тщательно промывают деионизированной водой. Далее растения собирают в конце жизненного цикла (около 140 дней), измеряют соотношение сухого вещества и количества общего азота и изотопа ^{15}N надземной части растений и семян. Таким образом, показано, что около 65% ^{15}N, поглощенного розетками в вегетативную фазу, ремобилизировалось в семена.

3.3. Модификации условий и их вклад в результаты исследований

Обычно питательный раствор в гидропонном контейнере постоянно аэрируют [39, 43, 44, 51], однако, некоторые исследования ставят под вопрос необходимость этой процедуры. Например, Arteca и Arteca [52] показали, что аэрация корневой системы не оказывает значимого влияния на массу корней и побегов, а также на развитие растений до цветения. Авторы делают вывод, что достаточная концентрация кислорода в растворе может быть обеспечена просто еженедельной заменой питательной среды, поскольку корневая система *A. thaliana* достаточно мала по сравнению с объемом используемого питательного раствора. В исследовании Gibeaut с соавт. [53] применяли аэрацию корней в течение 5 минут каждые полчаса, так как, по мнению авторов, колебания раствора при аэрации тормозили рост корней.

A. thaliana – факультативно длиннодневное растение. В большинстве литературных источни-

ков используется 16-часовой фотопериод для роста растений *A. thaliana*, цветение в этом случае начинается в течение трех недель. Время развития до цветения может быть увеличено путем изменения длины светового дня [54]. Для изучения влияния освещенности растения выращивали в прозрачных контейнерах, накрывая несколькими слоями марли до достижения освещенности 125, 100, 50 и 25 μмоль/м^2 с. Между первыми двумя вариантами наблюдались незначительные различия, тогда как при 50 μмоль/м^2 с рост растений подавлялся; освещенность 25 μмоль/м^2 с оказывала еще большее влияние на рост, а также вызывала задержку цветения и снижение соотношения корней и побегов [52].

Температура окружающей среды является важным фактором для роста и развития растений. В литературе чаще всего можно встретить температуру культивирования *A. thaliana* в диапазоне от 16 до 25°C. В исследовании Arteca и Arteca [52] рассматривались температуры от 15 до 30°C, и авторы не наблюдали существенной разницы в росте растений при температурах 18–24°C. Более низкие и более высокие температуры вызывали подавление роста *A. thaliana* экотипа Columbia.

Для выращивания растений *A. thaliana* методом гидропоники используют питательные растворы различного состава [39, 43, 44, 53]. В часто применяемом модифицированном растворе Хогланда в разведении ¼ содержание макроэлементов снижено до четверти, чтобы избежать возможных осмотических эффектов, ионной токсичности и неблагоприятных взаимодействий некоторых питательных веществ, в то время как микроэлементы сохраняют в полном объеме, чтобы предотвратить их истощение. Применение сред без разведения (Гамборга [67], Хогланда или МС) приводит к задержке роста и появлению стрессовых фенотипов. В различных работах проведены обширные исследования по подбору раствора для выращивания растений различных экотипов *A. thaliana* и мутантных линий [55, 56].

Следует отметить, что возможно выращивать *A. thaliana* в гидропонной культуре в стерильных условиях. Schlesier с соавт. [57] разработали методику, все материалы и оборудование для которой могут быть подвергнуты стерилизации. Авторы использовали стеклянные сосуды, в которые помещали стальную сетку. На поверхность сетки по каплям наносили стерилизованные семена, ресуспендированные в автоклавированном агарозно-сахарозном растворе. Капли застывали, после чего сосуды наполняли до уровня сетки автоклавированной жидкой ¼ МС-средой с добавлением сахарозы и витаминов. Сверху сосуды закрывали крышками или автоклавированным целлофаном. Нижнюю часть контейнеров помещали в темные емкости для предотвращения проникновения света к корням, выращивали растения в климатической камере при контролируемых температурных условиях и освещенности. Таким образом, группа получила из одного сосуда с сеткой площадью 28 см^2 200 мг материала корней и более 2 г листьев (сырой вес) растений в трехнедельном возрасте. По мнению авторов, биоматериала из нескольких таких сосудов будет достаточно для большинства исследовательских целей: например, биохимического анализа тканей или отдельных органов. Однако некоторые исследования показывают, что нет необходимости в стерильности при выращивании *A. thaliana* на гидропонике [52, 58], это только удорожает и усложняет методику. Многие исследовали отмечают, что основной контаминирующий организм – водоросли, развитие которых можно предотвратить, если не допускать проникновения света к субстрату, на котором они могут поселиться: пробке из агаризованной среды или минеральной ваты, песку, пропитанному питательным раствором, или самому питательному раствору.

3.4. Преимущества

Основным преимуществом гидропонных систем культивирования растений является возможность исследовать корневую систему; причем не только визуально при помощи фотографирования, окрашивания [52] с применением соответствующего программного обеспечения для обработки данных, но и анализировать содержание каких-либо интересующих соединений: нет необходимости очищать корни от субстрата, достаточно лишь аккуратно промыть их водой, и корни готовы для дальнейших манипуляций [59]. Кроме того, состав гидропонного раствора можно легко модифицировать – как и при культивировании на агаризованных питательных средах. Например, в эксперименте Ahn с соавт. [48] *A. thaliana* подвергали временному лишению ионов K^+ или избытку ионов Na^+ или K^+ на одни и шесть суток. Для этого корни растений, выращенных в гидропонном резервуаре, промывали водой и переносили в раствор, который приготовили без нужных ионов, затем промывали корни снова и помещали растения обратно в полный питательный раствор. Такая смена состава раствора без опасности повреждения корня невозможна при использовании твердых субстратов (агаризованной среды, почвы и других сыпучих материалов, минеральной ваты и др.).

3.5. Ограничения

В каждой лаборатории к выращиванию растений в условиях гидропоники подходят по-своему, и, как следствие, системы очень различаются с точки зрения воспроизводимости результатов экспери-

Таблица 1. Методы выращивания растений *Arabidopsis thaliana* в лабораторных условиях

	Стерильное культивирование *in vitro*	Почва и почвенные смеси	Гидропоника
Возможности метода	• проростки и их части (до 12–14 дней) • динамика развития проростков • параметры корневой системы (вертикальное выращивание) • отбор трансформантов	• фенотип надземной части • динамика роста и развития растений вплоть до старения • материал для биохимических и молекулярных исследований • физиологические процессы • погружение цветков • модификации внешних условий и воздействия стрессов	• те же данные и материалы, какие получают при выращивании в почве • фенотип надземной части и корня • материал чистый (в сравнении с почвой)
Ограничения	• размер растений ограничивается размером емкости • необходимость стерилизации семян, среды, емкостей, а также проведение манипуляций в стерильных условиях	• сложность анализа корневой системы • возможность контаминации биоматериала микроорганизмами почвы и ее частицами	• относительно сложная установка • возможность загрязнения питательной среды водорослями
Преимущества	• простота метода: посадка не вызывает сложностей, и растения после нее не нуждаются в дополнительном уходе • контролируемые условия культивирования • стерильные условия	• возможность выращивать растения до любого возраста, вплоть до получения семян и увядания • простота метода: после посадки необходимо только одно прореживание и полив, стерилизация не применяется	• возможность манипулирования как побегом, так и корневой системой • возможность выращивать растения до любого возраста, вплоть до получения семян и увядания • легкость варьирования составом питательного раствора

ментов. Протокол выращивания подбирают в зависимости от необходимого биоматериала, доступного оборудования и условий эксперимента.

Недостаток как гидропоники, так и чашек с агаризованными питательными средами заключается в том, что они не учитывают различную морфологию корневой системы разных видов растений: например, наличие (как у *A. thaliana*) или отсутствие корневых волосков. Некоторые растения, в условиях почвы образующие корневые волоски, на гидропонике их не имеют [48].

Для всех гидропонных систем характерна существенная проблема, связанная с загрязнением питательной среды водорослями. Контаминация корней и побегов растений происходит при использовании нестерильной богатой фосфором среды (например, минеральной ваты или пробки из агаризованной среды) и при доступе света. Рост водорослей снижает эффективность усвоения питательных веществ, нарушает состав питательного раствора и его pH, что может повлиять на результаты экспериментов [60, 61]. Исключение попадания света в камеры с питательным раствором и на субстрат – залог предотвращения загрязнения водорослями и репрезентативности проводимых исследований.

Также использование минеральной ваты или губки препятствует свободному доступу к корневой системе и может приводить к обводнению апикальных меристем [42, 51, 53, 62]. Поэтому необходимо тщательно подходить к выбору способа посадки растений, особенно если для целей исследования необходимо получение корней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изначально *A. thaliana* являлся сорным растением, он не представляет практического интереса для сельского хозяйства. Однако сейчас этот “сорняк” по количеству исследований с его использованием составляет конкуренцию любому хозяйственно ценному растению. Большая часть этих исследований подразумевает получение растительного материала.

Именно в зависимости от требуемого материала подбирают способ культивирования растительного

объекта. При планировании эксперимента нужно иметь четкое представление о том, какие именно данные с помощью каких методов необходимо получить.

У каждого метода выращивания есть свои преимущества, возможности и ограничения. Агаризованные питательные среды позволяют получать стерильный материал, но имеется ограничение по возрасту. Почва позволяет легко получать растения любого возраста, но без возможности исследования корней. Использование гидропоники дает гибкую экспериментальную платформу для манипулирования как побегом, так и корневой системой растения, но такое выращивание трудно стандартизировать и получить воспроизводимые результаты в разных лабораториях.

Из всего вышеизложенного можно заключить, что выбор способа культивирования растительного объекта является непростой задачей. На ее решение влияет множество факторов, которые индивидуальны для каждого уникального исследования, поэтому не существует единственно верного выбора.

В таблице 1 кратко перечислены основные тезисы статьи.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00057) (раздел 1 и 3) и в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9).

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. *The Arabidopsis Genome Initiative*. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2000. V. 408. P. 796. https://doi.org/10.1038/35048692
2. *Borrelli V.M.G., Brambilla V., Rogowsky P., Marocco A., Lanubile A.* The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01245
3. *Zhao Y., Zhang C., Liu W., Gao W., Liu C., Song G., Li W.X., Mao L., Chen B., Xu Y., Li X., Xie C.* An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design // Sci. Rep. 2016. V. 6. https://doi.org/10.1038/SREP23890
4. *Pyott D.E., Sheehan E., Molnar A.* Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants // Mol. Plant Pathol. 2016. V. 17. P. 1276. https://doi.org/10.1111/MPP.12417
5. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
6. *Lindsey B.E., Rivero L., Calhoun C.S., Grotewold E., Brkljacic J.* Standardized method for high-throughput sterilization of *Arabidopsis* seeds // J. Visualized Exp. 2017. V. 2017. P. e56587. https://doi.org/10.3791/56587
7. *Ried M.K., Banhara A., Hwu F.Y., Binder A., Gust A.A., Höfle C., Hückelhoven R., Nürnberger T., Parniske M.* A set of *Arabidopsis* genes involved in the accommodation of the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* // PLoS Pathog. 2019. V. 15. P. 1. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007747
8. *Niñoles R., Ruiz-Pastor C.M., Arjona-Mudarra P., Casañ J., Renard J., Bueso E., Mateos R., Serrano R., Gadea J.* Transcription factor DOF4.1 regulates seed longevity in *Arabidopsis* via seed permeability and modulation of seed storage protein accumulation // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. P. 1. https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.915184
9. *Ugena L., Hýlová A., Podlešáková K., Humplík J.F., Doležal K., Diego N. de, Spíchal L.* Characterization of biostimulant mode of action using novel multi-trait high-throughput screening of *Arabidopsis* germination and rosette growth // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1. https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01327
10. *Adhikari N.D., Bates P.D., Browse J.* WRINKLED1 rescues feedback inhibition of fatty acid synthesis in hydroxylase-expressing seeds // Plant Physiol. 2016. V. 171. P. 179. https://doi.org/10.1104/PP.15.01906
11. *Lothier J., Gaufichon L., Sormani R., Lemaître T., Azzopardi M., Morin H., Chardon F., Reisdorf-Cren M., Avice J.C., Masclaux-Daubresse C.* The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 1375. https://doi.org/10.1093/JXB/ERQ299
12. *Cui D., Yin Y., Wang J., Wang Z., Ding H., Ma R., Jiao Z.* Research on the physio-biochemical mechanism of non-thermal plasma-regulated seed germination and early seedling development in Arabidopsis // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 1. https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01322
13. *Han X., Tang S., An Y., Zheng D.C., Xia X.L., Yin W.L.* Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 4589. https://doi.org/10.1093/JXB/ERT262
14. *Vandepol N., Liber J., Yocca A., Matlock J., Edger P., Bonito G. Linnemannia elongata* (Mortierellaceae) stimulates *Arabidopsis thaliana* aerial growth and responses to auxin, ethylene, and reactive oxygen species // PLoS One. 2022. V. 17. P. 1. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0261908
15. *Ciou H.S., Tsai Y.L., Chiu C.C. Arabidopsis* chloroplast J protein DJC75/CRRJ mediates nitrate-promoted

seed germination in the dark // Ann. Bot. 2020. V. 125. P. 1091.
https://doi.org/10.1093/AOB/MCAA040

16. *Seok H.Y., Bae H., Kim T., Mehdi S.M.M., Nguyen L.V., Lee S.Y., Moon Y.H.* Non-TZF protein ATC3H59/ZF-WD3 is involved in seed germination, seedling development, and seed development, interacting with PPPDE family protein Desi1 in *Arabidopsis* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 1.
https://doi.org/10.3390/IJMS22094738

17. *Lim S.D., Yim W.C., Liu D., Hu R., Yang X., Cushman J.C.* A *Vitis vinifera* basic helix–loop–helix transcription factor enhances plant cell size, vegetative biomass and reproductive yield // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. P. 1595.
https://doi.org/10.1111/PBI.12898

18. *Bayon S., Chen G., Weselake R.J., Browse J.* A small phospholipase A2-α from castor catalyzes the removal of hydroxy fatty acids from phosphatidylcholine in transgenic *Arabidopsis* seeds // Plant Physiol. 2015. V. 167. P. 1259.
https://doi.org/10.1104/PP.114.253641

19. *Takatani N., Ito T., Kiba T., Mori M., Miyamoto T., Maeda S.I., Omata T.* Effects of high CO2 on growth and metabolism of *Arabidopsis* seedlings during growth with a constantly limited supply of nitrogen // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. P. 281.
https://doi.org/10.1093/PCP/PCT186

20. *Ariyarathne M.A., Wone B.W.M.* Overexpression of the *Selaginella lepidophylla* bHLH transcription factor enhances water-use efficiency, growth, and development in *Arabidopsis* // Plant Sci. 2022. V. 315. P. 111129.
https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2021.111129

21. *Lucek K., Hohmann N., Willi Y.* Postglacial ecotype formation under outcrossing and self-fertilization in *Arabidopsis lyrata* // Mol. Ecol. 2019. V. 28. P. 1043.
https://doi.org/10.1111/MEC.15035

22. *Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M.* Identification of plant stress-responsive determinants in *Arabidopsis* by large-scale forward genetic screens // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 1119.
https://doi.org/10.1093/JXB/ERJ093

23. *Tholen D., Voesenek L.A.C.J., Poorter H.* Ethylene insensitivity does not increase leaf area or relative growth rate in Arabidopsis, *Nicotiana tabacum*, and *Petunia x hybrida* // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1803.
https://doi.org/10.1104/PP.103.034389

24. *Matuszkiewicz M., Koter M.D., Filipecki M.* Limited ventilation causes stress and changes in *Arabidopsis* morphological, physiological and molecular phenotype during in vitro growth // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 135. P. 554.
https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.11.003

25. *Basu P., Kruse C.P.S., Luesse D.R., Wyatt S.E.* Growth in spaceflight hardware results in alterations to the transcriptome and proteome // Life Sci. Space Res. 2017. V. 15. P. 88.
https://doi.org/10.1016/J.LSSR.2017.09.001

26. *Ryu C.M., Faragt M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Paré P.W., Kloepper J.W.* Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003. V. 100. P. 4927.
https://doi.org/10.1073/PNAS.0730845100

27. *Xie X., Zhang H., Paré P.W.* Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) // Plant Signal. Behav. 2009. V. 4. P. 948.
https://doi.org/10.4161/PSB.4.10.9709

28. *Bac-Molenaar J.A., Granier C., Keurentjes J.J.B., Vreugdenhil D.* Genome-wide association mapping of time-dependent growth responses to moderate drought stress in *Arabidopsis* // Plant, Cell Environ. 2016. V. 39. P. 88.
https://doi.org/10.1111/PCE.12595

29. *Yang Z., Liu J., Tischer S.V., Christmann A., Windisch W., Schnyder H., Grill E.* Leveraging abscisic acid receptors for efficient water use in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. V. 113. P. 6791.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1601954113

30. *Cross J.M., von Korff M., Altmann T., Bartzetko L., Sulpice R., Gibon Y., Palacios N., Stitt M.* Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions // Plant Physiol. 2006. V. 142. P. 1574.
https://doi.org/10.1104/PP.106.086629

31. *Drake T., Keating M., Summers R., Yochikawa A., Pitman T., Dodd A.N.* The cultivation of *Arabidopsis* for experimental research using commercially available peat-based and peat-free growing media // PLoS One. 2016. V. 11. P. 1.
https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153625

32. *Rutter M.T., Murren C.J., Callahan H.S., Bisner A.M., Leebens-Mack J., Wolyniak M.J., Strand A.E.* Distributed phenomics with the unPAK project reveals the effects of mutations // Plant J. 2019. V. 100. P. 199.
https://doi.org/10.1111/TPJ.14427

33. *Groot M.P., Kubisch A., Ouborg N.J., Pagel J., Schmid K.J., Vergeer P., Lampei C.* Transgenerational effects of mild heat in *Arabidopsis thaliana* show strong genotype specificity that is explained by climate at origin // New Phytol. 2017. V. 215. P. 1221.
https://doi.org/10.1111/NPH.14642

34. *Granier C., Aguirrezabal L., Chenu K., Cookson S.J., Dauzat M., Hamard P., Thioux J.J., Rolland G., Bouchier-Combaud S., Lebaudy A., Muller B., Simonneau T., Tardieu F.* PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit // New Phytol. 2006. V. 169. P. 623.
https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01609.X

35. *Diaz C., Lemaître T., Christ A., Azzopardi M., Kato Y., Sato F., Morot-Gaudry J.F., le Dily F., Masclaux-Daubresse C.* Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1437.
https://doi.org/10.1104/PP.108.119040

36. *Zhang X., Henriques R., Lin S.S., Niu Q.W., Chua N.H.* *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 641. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97
37. *Guo D., Song X., Yuan M., Wang Z., Ge W., Wang L., Wang J., Wang X.* RNA-Seq profiling shows divergent gene expression patterns in *Arabidopsis* grown under different densities // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1. https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.02001
38. *Hershey D.R.* Solution culture hydroponics: history and inexpensive equipment // Amer. Biol. Teach. 1994. V. 56. P. 111. https://doi.org/10.2307/4449764
39. *Rodecap K.D., Tingey D.T., Lee E.H.* Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // J. Environ. Qual. 1994. V. 23. P. 239. https://doi.org/10.2134/JEQ1994.00472425002300020004X
40. *Lemaître T., Gaufichon L., Boutet-Mercey S., Christ A., Masclaux-Daubresse C.* Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana Wassileskija* accession // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 1056. https://doi.org/10.1093/PCP/PCN081
41. *Conn S.J., Hocking B., Dayod M., Xu B., Athman A., Henderson S., Aukett L., Conn V., Shearer M.K., Fuentes S., Tyerman S.D., Gilliham M.* Protocol: Optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants // Plant Meth. 2013. V. 9. P. 1. https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-4
42. *Robison M.M., Smid M.P.L., Wolyn D.J.* High-quality and homogeneous *Arabidopsis thaliana* plants from a simple and inexpensive method of hydroponic cultivation // Can. J. Bot. 2006. V. 84. P. 1009. https://doi.org/10.1139/b06-054
43. *Delhaize E., Randall P.J.* Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 1995. V. 107. P. 207. https://doi.org/10.1104/PP.107.1.207
44. *Hirai M.Y., Fujiwara T., Chino M., Naito S.* Effects of sulfate concentrations on the expression of a soybean seed storage protein gene and its reversibility in transgenic *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 1995. V. 36. P. 1331.
45. *Berezin I., Elazar M., Gaash R., Avramov-Mor M., Shaul O.* The use of hydroponic growth systems to study the root and shoot ionome of *Arabidopsis thaliana* // Hydroponics – a standard methodology for plant biological researches. 2012. https://doi.org/10.5772/36558
46. *Hermans C., Verbruggen N.* Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2153. https://doi.org/10.1093/JXB/ERI215
47. *Johnston-Monje D., Gutiérrez J.P., Lopez-Lavalle L.A.B.* Seed-transmitted bacteria and fungi dominate juvenile plant microbiomes // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 1. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.737616
48. *Ahn S.J., Shin R., Schachtman D.P.* Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K^+ uptake // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1135. https://doi.org/10.1104/PP.103.034660
49. *Yoo S.D., Cho Y.H., Sheen J.* *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 1565. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199
50. *Harrison S.J., Mott E.K., Parsley K., Aspinall S., Gray J.C., Cottage A.* A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation // Plant Meth. 2006. V. 2. P. 1. https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19/FIGURES/4
51. *Smeets K., Ruytinx J., van Belleghem F., Semane B., Lin D., Vangronsveld J., Cuypers A.* Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. Biochem. 2008. V. 46. P. 212. https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2007.09.014
52. *Arteca R.N., Arteca J.M.* A novel method for growing *Arabidopsis thaliana* plants hydroponically // Physiol. Plant. 2000. V. 108. P. 188. https://doi.org/10.1034/J.1399-3054.2000.108002188.X
53. *Gibeaut D.M., Hulett J., Cramer G.R., Seemann J.R.* Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 317. https://doi.org/10.1104/PP.115.2.317
54. *Martinez-Zapater J.M., Coupland G., Dean C., Koornneef M.* The transition to flowering in *Arabidopsis* // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994. P. 403
55. *Conn S.J., Conn V., Tyerman S.D., Kaiser B.N., Leigh R.A., Gilliham M.* Magnesium transporters, MGT2/MRS2-1 and MGT3/MRS2-5, are important for magnesium partitioning within *Arabidopsis thaliana* mesophyll vacuoles // New Phytol. 2011. V. 190. P. 583. https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2010.03619.X
56. *Conn S.J., Gilliham M., Athman A., Schreiber A.W., Baumann U., Moller I., Cheng N.H., Stancombe M.A., Hirschi K.D., Webb A.A.R., Burton R., Kaiser B.N., Tyerman S.D., Leigh R.A.* Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in Arabidopsis // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 240. https://doi.org/10.1105/TPC.109.072769
57. *Schlesier B., Bréton F., Mock H.P.* A hydroponic culture system for growing *Arabidopsis thaliana* plantlets under sterile conditions // Plant Mol. Biol. Rep. 2012. V. 21. P. 449. https://doi.org/10.1007/BF02772594
58. *Tocquin P., Corbesier L., Havelange A., Pieltain A., Kurtem E., Bernier G., Périlleux C.* A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana* // BMC Plant Biol. 2003. V. 3. P. 1. https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-2/TABLES/3

59. *Rhee S.Y.* Bioinformatic resources, challenges, and opportunities using *Arabidopsis* as a model organism in a post-genomic era // Plant Physiol. 2000. V. 124. P. 1460. https://doi.org/10.1104/PP.124.4.1460

60. *Boller T., Felix G.* A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors // Annu. Rev. Plant Biol. 2009. V. 60. P. 379. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.57.032905.105346

61. *Huang C., Verrillo F., Renzone G., Arena S., Rocco M., Scaloni A., Marra M.* Response to biotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*: Analysis of variably phosphorylated proteins // J. Proteomics. 2011. V. 74. P. 1934. https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2011.05.016

62. *Huttner D., Bar-zvi D.* An improved, simple, hydroponic method for growing *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. Rep. 2012. V. 21. P. 59. https://doi.org/10.1007/BF02773397

63. *Holdsworth M.J., Bentsink L., Soppe W.J.J.* Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, afterripening, dormancy and germination // New Phytol. 2008. V. 179. P. 33. https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2008.02437.X

64. *Umezawa T., Okamoto M., Kushiro T., Nambara E., Oono Y., Seki M., Kobayashi M., Koshiba T., Kamiya Y., Shinozaki K.* CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2006. V. 46. P. 171. https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02683.X

65. *Wang X., Yesbergenova-Cuny Z., Biniek C., Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H., Corbineau F.* Revisiting the role of ethylene and N-end rule pathway on chilling-induced dormancy release in *Arabidopsis* seeds // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 3577. https://doi.org/10.3390/IJMS19113577

66. *Hoagland D.R.* The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif: College of Agriculture, University of California. 1950. P. 41.

67. *Gamborg O.L., Eveleigh D.E.* Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. V. 46. P. 417. https://doi.org/10.1139/O68-063

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 4, с. 433–448

ЛЕКЦИИ В ЖУРНАЛЕ

УДК 581.1

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ РАСТЕНИЙ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОБЫТИЯ, РЕГУЛЯЦИЯ ВНЕШНИМИ ФАКТОРАМИ И ФИТОГОРМОНАМИ

© 2023 г. А. В. Носов[a], *, А. А. Фоменков[a], **

[a]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия*

**e-mail: alexv.nosov@mail.ru*

***e-mail: artem.fomenkov@gmail.com*

Поступила в редакцию 21.11.2022 г.
После доработки 21.11.2022 г.
Принята к публикации 21.11.2022 г.

В данной лекции представлены классические сведения и новые данные о молекулярных событиях “базового” (core) клеточного цикла (КЦ) растений. Кратко рассмотрено влияние водного дефицита, CO_2, света и температуры на КЦ. Представлены данные о регуляции пролиферации клеток ауксинами, цитокининами, абсцизовой кислотой, гиббереллинами, брассиностероидами и этиленом. Обсуждаются закономерности и особенности влияния фитогормонов на КЦ в разных органах и тканях.

Ключевые слова: клеточный цикл, пролиферация клеток, фитогормоны, циклины, циклин-зависимые киназы, эндоредупликация

DOI: 10.31857/S0015330322600681, **EDN:** IBGHGJ

ВВЕДЕНИЕ

Деление клеток – основа существования любого многоклеточного организма, включая высшие растения. Здесь уместно вспомнить характеристику этого процесса, которую дал современник его открытия Edmund Wilson: “*благодаря делению клеток, по крайней мере во всех высших формах, осуществляется не только непрерывность жизни, но и сохранение вида; ибо с помощью этого прекрасного механизма клетка передает своим потомкам точную копию идиоплазмы, которая определяет ее собственную организацию.*” [1, с. 178].

Специфика растений состоит в том, что они развиваются и растут в основном постэмбрионально, образуя два типа органов: осевые органы, такие как корни и побеги, с недетерминированным ростом и, следовательно, с теоретически неограниченным потенциалом роста; и органы, такие как листья и цветки, с детерминированным ростом и фиксированным конечным размером. Клетки органов с детерминированным ростом на определенном этапе онтогенеза перестают делиться и переходят к растяжению, период которого также детерминирован [2]. Осевые органы растут в течение всей жизни растения. Такой постоянный и длительный рост обусловлен существованием апикальных меристем, клетки которых сохраняют способность к непрерывной пролиферации. Покидая меристематическую зону, клетки переходят к растяжению и дифференциации, причем переход к растяжению (росту с относительно бóльшей скоростью) или торможению роста происходит одновременно для клеток всех тканей, расположенных на одном и том же расстоянии от меристемы [3]. Следовательно, в целом растении рост и пролиферация клеток должны быть согласованы, что постоянно наблюдается и является очевидным фактом. Однако выяснение механизмов координации пролиферации и роста клеток, по-прежнему остается одной из важнейших задач экспериментальной биологии растений [4].

Специфика роста органов, безусловно, влияет на пространственно-временные характеристики пролиферации клеток и особенности ее регуляции. В этой лекции, в большей части, мы будем рассматривать молекулярную механику “базового” (core) клеточного цикла и его регуляцию под влиянием внешних факторов и фитогормонов.

Сокращения: КЦ – клеточный цикл; МЦ – митотический цикл; ТФ – транскрипционный(ые) фактор(ы); ЦК – цитокинин(ы); APC/C – Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome; CDK – циклин-зависимая(ые) киназа(ы); CYC – циклин(ы); DELLA-домен – Asp-Glu-Leu-Leu-Ala; KRP – Kip-related proteins (Kip-подобные белки – ингибиторы CDK); RBR1 – RETINOBLASTOMA-RELATED 1 (ретинобластома-подобный белок 1); SIM – SIAMESE белки (семейство ингибиторов CDK); SMR – SIM-related белки.

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ – ОСНОВНЫЕ ДЕФИНИЦИИ

Под пролиферацией клеток (от лат. *proles* – потомство и *fero* – несу) принято понимать их новообразование путем размножения делением. Пролиферативный или чаще обозначаемый как митотический цикл (МЦ) – комплекс взаимосвязанных и хронологически детерминированных событий, происходящих в клетке в период времени от начала подготовки к делению, на протяжении самого митоза и до завершения в двух дочерних клетках всех процессов, связанных с делением. Упрощая, можно дать такое определение МЦ: упорядоченная во времени последовательность событий, происходящих между двумя митозами. В этом году исполняется 70 лет со времени публикации классической работы Alma Howard и Stephen Pelc [5], в которой с помощью метода радиоавтографии изучали включение ^{32}P в ДНК клеток корня *Vicia faba* и выявили, что период синтеза ДНК занимает часть интерфазы и отделен временными интервалами от начала и окончания митоза. Авторы предложили разделить МЦ на четыре периода: собственно митоз (**M**), пресинтетический период ($\mathbf{G_1}$), период синтеза (репликации) ДНК (**S**) и постсинтетический (или премитотический) период ($\mathbf{G_2}$).

В непрерывно размножающихся популяциях клеток (эмбриональные ткани, меристемы и т. п.) очередной МЦ начинается сразу же поле окончания предыдущего, то есть его продолжительность совпадает со всем периодом существования клетки, равно как с ее жизненным (или клеточным) циклом (КЦ). Однако во взрослом многоклеточном организме часть клеток после завершения очередного раунда делений не начинает подготовку к следующему МЦ, а переходит к дифференциации и выполнению тканеспецифичных функций. Доля таких клеток может быть весьма значительной и период их жизни, в течение которого эти клетки выполняют специфические функции в отсутствие пролиферации, не относят к МЦ, а включают в КЦ. Отношение числа пролиферирующих (делящихся) клеток к общему числу клеток популяции получило название “фракции роста” или “пролиферативного пула”. Понятия МЦ и КЦ часто отождествляют для тех популяций, где эти циклы совпадают. Мы будем использовать понятие КЦ, тем не менее, акцентируя в определенных случаях существование различий.

Физиологическая роль фазы $\mathbf{G_1}$ заключается в осуществлении роста и связанных с ним процессов первичного метаболизма клеток. В данной стадии активно идут процессы транскрипции и трансляции, подготовка клеток к синтезу ДНК. Фаза $\mathbf{G_1}$ самая вариабельная из всех фаз КЦ. Существует взаимосвязь между интенсивностью делений клеток и продолжительностью $\mathbf{G_1}$-периода: как правило, он удлиняется с уменьшением пролиферативного потенциала клеток.

В **S**-периоде происходит удвоение (репликация) ДНК ядра, равномерно распределяемой впоследствии между двумя дочерними клетками. Содержание ДНК в ядре принято выражать значением “***C***”. В 1950 г. Hewson Swift ввел обозначение “***C***”, имея в виду постоянное (“***C***onstant”) содержание ДНК в клетках различных тканей организма [6]. За величину 1***C*** принимают количество ДНК в нереплицированном гаплоидном наборе хромосом [7]. В растениях количество ядерной ДНК варьирует в очень больших пределах. Наименьшее количество ДНК (0.1 пг), приходящееся на 1***C*** обнаружено у *Genlisea margaretae* [8], а наибольшее – 152.2 пг принадлежит *Paris japonica* [9]. Значения “***C***” определены для растений многих видов и доступны, например, в базе данных Kew Botanical Garden. Исходя из данных, имеющихся в литературе, можно сделать вывод, что продолжительность **S**-периода является результатом взаимодействия нескольких факторов, таких, как содержание ядерной ДНК и длина отдельных репликонов, количество и размер семейств репликонов, а также синхронность процессов, происходящих в отдельных семействах репликонов [10, 11].

Период $\mathbf{G_2}$, как правило, короче $\mathbf{G_1}$- и **S**-фазы, а вариации его длительности обычно меньше, чем у $\mathbf{G_1}$-периода. События фазы $\mathbf{G_2}$ связаны с завершением **S**-периода, реорганизацией цитоскелета и подготовкой к митозу. В митозе происходит равное распределение удвоенного хромосомного материала между дочерними клетками благодаря функционированию веретена деления. Митоз – наиболее короткий (в среднем 1 – 3 ч) и наименее вариабельный период КЦ.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОБЫТИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Многие процессы в жизни клеток контролируются обратимым фосфорилированием определенных белков-мишеней. У человека около 2% всех функционально активных генов кодируют протеинкиназы, а у *Arabidopsis thaliana* – около 4%, что, безусловно, подтверждает важную роль протеинкиназ для клеток животных и растений [12]. Наличие большого числа условно летальных мутантных штаммов по клеточному циклу – *cdc* (cell division cycle) мутантов, полученных у дрожжей, сформировало одно из направлений в изучении молекулярных механизмов контроля пролиферации. Это направление связано с изолированием генов, способных исправлять дефекты у *cdc* мутантов дрожжей. Центральное место среди таких генов заняли *cdc2* у *Schizosaccharomyces pombe* или *CDC28* у *Saccharomyces cerevisiae*, кодирующие 34-кД белок ($p34^{cdc2}$) – серин/треониновую протеинкиназу,

активность которой, зависящая в свою очередь от фосфорилирования или дефосфорилирования собственных аминокислотных остатков, необходима для прохождения клетками дрожжей границ между **G_1-** и **S-**, а также **G_2-** и **M-**периодами КЦ. Было показано, что ген человека, аналогичный *cdc2*$^+$ *S. pombe*, также (наряду с *CDC28*$^+$) способен комплементировать мутацию *cdc2*$^-$ у *S. pombe* [13]. В дальнейшем было обнаружено несколько групп белков, выявляемых только в определенных периодах КЦ, названных циклинами. В ответ на пролиферативные стимулы, например, факторы роста, в клетках млекопитающих появляются формы D-циклинов, которые взаимодействуют с протеинкиназами Cdk4 и/или Cdk6 (Cdk – циклин-зависимые киназы), что приводит к фосфорилированию белков-супрессоров, таких как pRb – супрессор опухолевого роста, впервые обнаруженный в клетках ретинобластомы, и ему подобных белков. Это приводит к активации транскрипционных факторов (ТФ) E2F-типа, которые высвобождаются из комплекса с белками-супрессорами, и включается экспрессия генов, необходимых для перехода из **G_1-** в **S-**период КЦ [14]. Далее, на границе **G_1/S** экспрессируется циклин E и связывается с Cdk2. Активность этого комплекса необходима для перехода указанной границы и запуска репликации ДНК. Прохождение **S**-периода требует взаимодействия Cdk2 с циклином A, в митозе работает циклин B. Функционирование комплексов Cdk–циклин регулируется двумя семействами ингибиторов Cdk как в нормальных условиях, так и (преимущественно) при стрессах, повреждениях ДНК, дисфункции теломер и др. Представители семейства INK4 специфично связываются с Cdk4 и Cdk6 и препятствуют работе циклинов D-типа, а белки семейства Cip/Kip ингибируют комплексы Cdk2–циклин E, Cdk2–циклин A, Cdk1–циклин A и Cdk1–циклин B [14].

А что же у растений? Еще в 60-е годы прошлого столетия Jack Van't Hof продемонстрировал на отделенных кончиках корней *Pisum sativum* – отсутствие сахарозы в среде или обработка пуромицином приводит к аресту КЦ в **G_1-** или **G_2-**периоде, что согласуется с парадигмой о главных контрольных точках КЦ при переходе **G_1/S** и **G_2/M** и говорит о необходимости синтеза белка для их успешного прохождения [15]. Более того, каскад протеинкиназных и протеинфосфатазных реакций, управляющих КЦ, является универсальным и для клеток растений. По современным представлениям [16–19] продвижение по КЦ обеспечивается скоординированным взаимодействием множества белков-регуляторов, среди которых ключевые позиции, так же как у млекопитающих, занимают циклины (CYC) и серин/треониновые протеинкиназы, называемые циклин-зависимыми киназами (CDK), экспрессирующиеся в определенные временные периоды КЦ. Растения обладают наибольшим числом белков-регуляторов КЦ и своими уникальными представителями, например, только у растений есть CDK B-типа [20]. В *A. thaliana* 13 белков относят к CDK и 49 белков относят к CYC, хотя не все они "замечены" в процессах регуляции КЦ [20–22]. Каждый тип включает подклассы, например, у *A. thaliana* – CYCA2;3 – третий представитель второго подкласса циклинов A-типа, правда пока не показано, что все виды растений имеют все типы CYC и CDK. Даже внутри одного подкласса CYC отличаются не только по "графику" их работы в КЦ, но и по типу и числу CDK, ингибиторов и структурных белков, с которыми они могут взаимодействовать, указывая на значительную функциональную диверсификацию механизмов контроля КЦ. Так, например, у *A. thaliana*, по данным интерактома обнаружено 92 потенциальных варианта комплексов CDK–CYC [21].

Тем не менее, существует три типа циклинов, для которых постулирована роль в регуляции КЦ: CYCA, CYCB и CYCD [23]. Специфичные комплексы CDK–CYC регулируют переход в основных контрольных точках КЦ (**G_1/S** и **G_2/M**).

Комплексы CDKA;1–CYCD обеспечивают переход из **G_1-** в **S**-период путем фосфорилирования белка RBR1 (RETINOBLASTOMA-RELATED 1, ретинобластома-подобный белок 1) с последующим его протеолизом, и тем самым освобождают ТФ – E2Fa и E2Fb, которые в комплексе с белками димеризации (DPa) обеспечивают "**G_1**-волну транскрипции" [24], активируя экспрессию **G_1/S**-фазных генов (рис. 1а, б). Здесь следует добавить, что RB-подобные белки (RBR) являются ранним приобретением в ходе эволюции и присутствуют в голосеменных и покрытосеменных растениях, одноклеточных водорослях, папоротниках, печеночниках и мхах. RBR1 регулирует не только переход **G_1/S**, но и функционирует в составе комплексов DREAM, активируя экспрессию генов в **G_2**-периоде и генов, не связанных с КЦ, а также участвует в сохранении стволовых клеток и регуляции асимметричных делений [19, 25].

Комплексы CDKA;1–CYCA3 контролируют прохождение **S**-фазы, CDKB1–CYCA2/B2/B3 обеспечивают прохождение **G_2**-периода и инициацию митоза, а CDKB2–CYCB1 и CDKA–CYCD3;1 ответственны за прохождение митоза (рис. 1а). Недавно обнаружено, что CYCB1 играют ключевую роль в организации митотической сети микротрубочек, образуя активные комплексы с CDKB2;2 и фосфорилируя белки-организаторы тубулинового цитоскелета [26].

Данные, полученные на синхронизированной культуре клеток *A. thaliana* с помощью ДНК-микрочипов [27] хорошо подтверждают "**G_2**-волну транскрипции". Многие гены, экспрессия которых

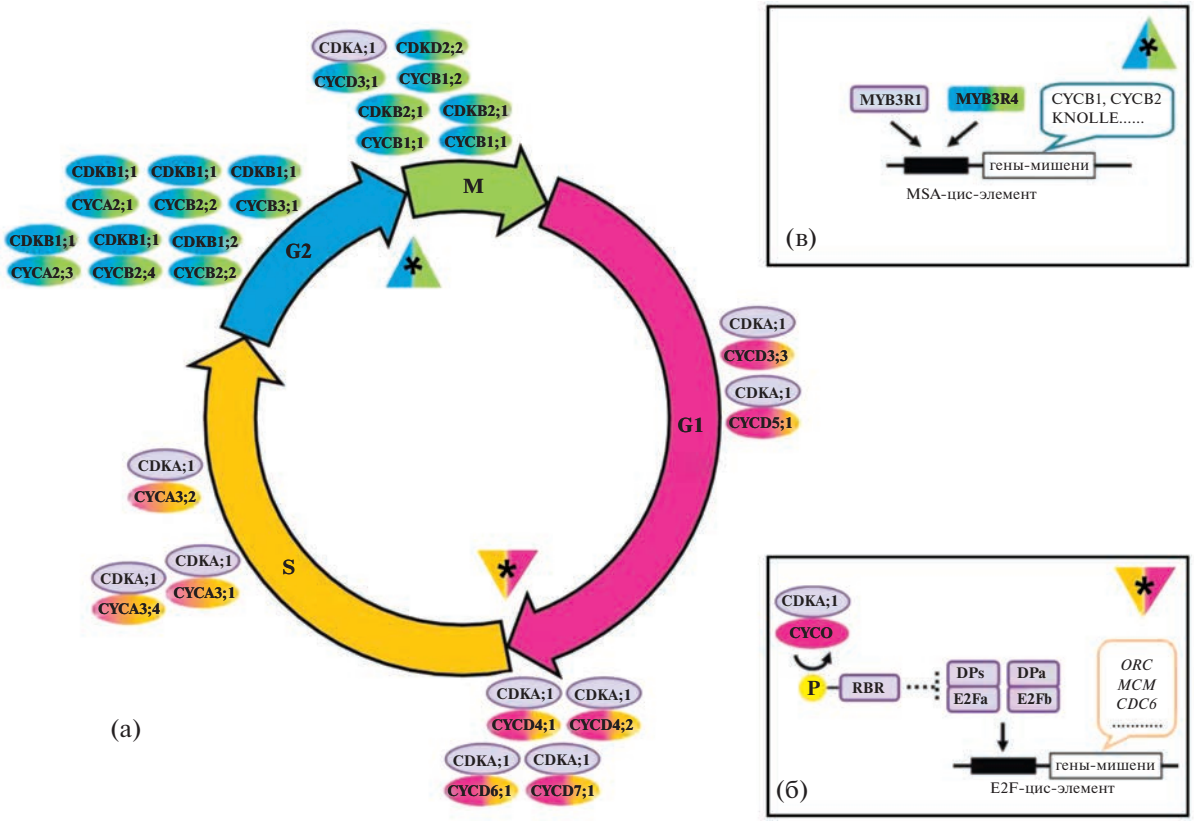


Рис. 1. Циклины (CYC) и циклин-зависимые протеинкиназы (CDK) – основные регуляторы КЦ. Многие CYC и CDK экспрессируются в определенное время КЦ и их комбинаторное взаимодействие регулирует его продвижение (а). Экспрессия генов, поддерживающих переход $\mathbf{G_1/S}$ КЦ, обеспечивается функционированием комплексов CDKA;1–CYCD, фосфорилирующих белок RBR1 с последующим его протеолизом, освобождением ТФ E2Fa и E2Fb, которые в комплексе с белками DPa обеспечивают "$\mathbf{G_1}$-волну транскрипции" (б). Многие гены, экспрессия которых приурочена к $\mathbf{G_2}$ и **M** периодам КЦ, содержат в промоторной области MSA-мотивы (mitosis-specific activator), которые узнают ТФ MYB3R (митотические комплексы CDK–CYC фосфорилируют и активируют MYB3R), обеспечивающие "$\mathbf{G_2}$-волну транскрипции" (в). Экспрессия генов *CDK* и *CYC* и функционирование соответствующих им белков помечено цветом: для $\mathbf{G_1}$-, **S**-, $\mathbf{G_2}$- и **M**-периодов – розовым, желтым, синим и зеленым соответственно. Гены и их продукты, постоянно экспрессирующиеся в течение КЦ, отмечены светло сиреневым цветом. *KNOLLE* – ген *A. thaliana*, необходимый для цитокинеза, кодирует белок подобный, синтаксинам. *ORC* (*Origin Recognition Complex*), *CDC6* (*Cell Division Control 6*), *MCM* (*Minichromosome Maintenance*) – гены, кодирующие белки пререпликативных комплексов (по Komaki и Sugimoto [111] с дополнениями и модификациями).

приурочена к $\mathbf{G_2/M}$ переходу КЦ (рис. 1в), содержат в промоторной области так называемые MSA-мотивы (mitosis-specific activator), которые узнают ТФ типа MYB3R (такие как MYB3R1 и MYB3R4 у *A. thaliana*). К генам, экспрессия которых активируется подобным образом, относятся, например, *CYCB1* и *CYCB2*, а также *KNOLLE*, активность которого необходима для формирования клеточной пластинки после завершения митоза [28]. В свою очередь, митотические комплексы CDK–CYC фосфорилируют и активируют MYB3R [29].

Функционирование CDK тонко регулируется: фосфорилирование Tpe160 (или эквивалентного остатка треонина) CDK-активирующими киназами (CAK) приводит к активации CDK [30]. Фосфорилирование N-концевого остатка тирозина протеинкиназой WEE1 приводит к инактивации CDK, при этом WEE1 обычно более активна при повреждениях ДНК (репликационный стресс). Предполагается, что WEE1 задерживает прохождение **S**-фазы, чтобы обеспечить репарацию ДНК (рис. 2) [31]. Кроме того, у кукурузы и томатов активность WEE1 сопряжена с эндоредупликацией [32].

Дополнительно активность CDK специфично ингибируют CKI (CDK Inhibitors). В растениях Kip-подобные белки (kip-related proteins, KRP или ингибиторы CDK, или ICK) содержат консервативный домен сходный с аналогичным доменом белков семейства Cip/Kip млекопитающих. У *A. thaliana* KRP-белки кодируют семь генов [33] и ингибируют CDK в $\mathbf{G_1/S}$ (рис. 2), что приводит к остановке МЦ и коммитирует клетки к эндоредупликации [16, 21, 32]. Второе семейство инги-

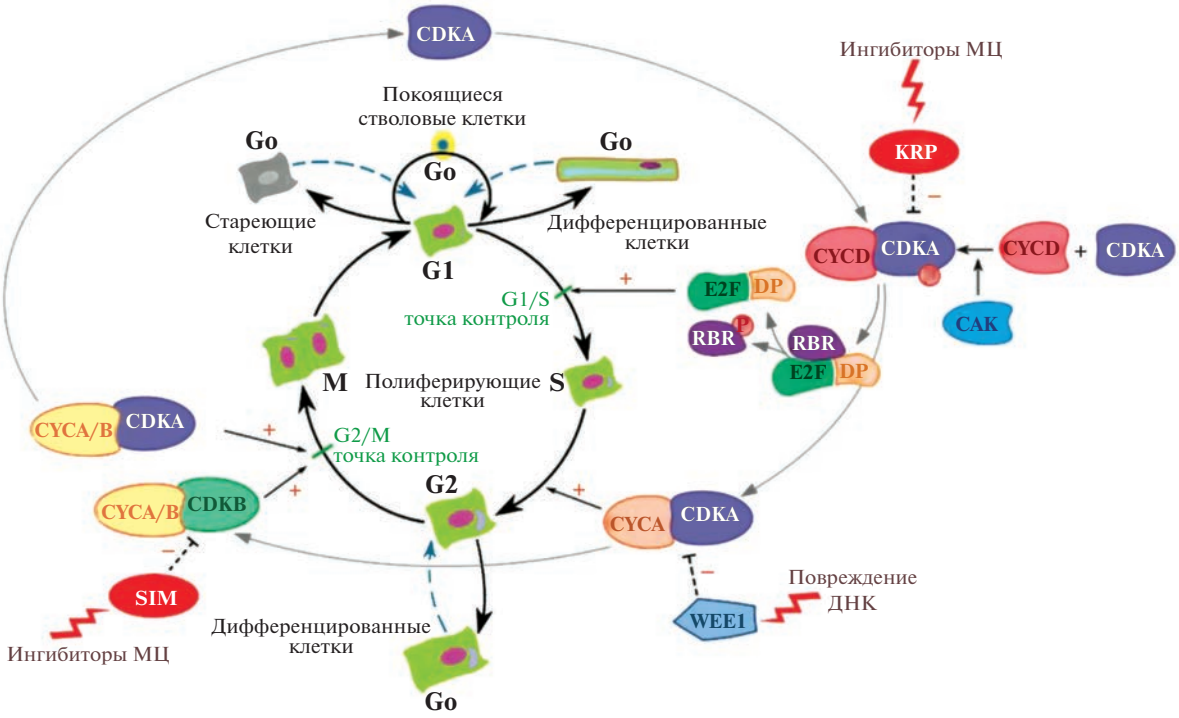


Рис. 2. Основные пункты функционирования активаторов и ингибиторов CDK и выхода клеток из МЦ. G_0 – состояние пролиферативного покоя клеток, присущее дифференцированным, стареющим и стволовым клеткам. В G_0 возможен выход из G_1- и G_2-периодов. При определенных условиях, например, гормональных стимулах, клетки могут вернуться из G_0 в МЦ. CAK – CDK-активирующие протеинкиназы; WEE – CDK-инактивирующая протеинкиназа; KRP и SIM – ингибиторы CYC–CDK комплексов (по Velappan et al. [112] с дополнениями и модификациями).

биторов CDK, известное как SIAMESE (SIM-белки), было обнаружено в связи с анализом мутантных растений *A. thaliana* с нарушенным развитием трихом листьев [34]. Многие представители белков SMR (SIM-related) могут взаимодействовать с CYCD и CDKA;1 [21, 34], но в основном, SIM-белки взаимодействуют с CDKB1;1 [21, 32] (рис. 2). Возможность регуляции SMR-белками CDKA–CYCD комплексов вероятно важна для адекватного контроля КЦ при действии биотических и абиотических стрессоров [35]. Интересно, что, например, SMR4 взаимодействует с CYCD3;1 и замедляет G_1 в последнем асимметричном делении, предшествующем симметричному делению, формирующему устьичные клетки [36].

Одно из самых ранних событий КЦ – лицензирование ДНК (точнее хроматина) – процесс активного доступа к хроматину и “заякоривания” на нем белков и белковых комплексов, включающих факторы репликации ДНК и модифицирующие хроматин белки [24]. Репликация генома эукариот требует активации тысяч точек начала репликации (replication origins, ORIs), с которыми должны связаться комплексы инициации. Эти первичные регуляторные события – ассоциация пререпликативных комплексов (pre-RC) с каждой потенциальной точкой начала репликации, активируются в поздней телофазе практически сразу после распределения двух вновь сформированных ядер по дочерним клеткам. Происходит последовательная сборка консервативного мультисубъединичного комплекса, содержащего шесть белков ORC (Origin Recognition Complex), АТФ связывающий белок CDC6 (Cell Division Control 6), фактор лицензирования хроматина и репликации ДНК 1 (CDT1) и гетерогексамер из шести белков-хеликаз MCM (Minichromosome Maintenance) [19, 37].

В раннем G_1-периоде активность CDK должна быть низкой, что необходимо для лицензирования точек начала репликации. Позднее активность CDK возрастает за счет повышения уровня необходимых для этого CYC G_1-периода (см. рис. 1а), достигая порога достаточного для инактивации RBR1 и старта (firing) работы репликонов, то есть запуска **S**-периода. Прохождение **S**-периода обеспечивают специфичные CDK–CYC комплексы, в G_2-периоде активно транскрибируются CYC **M**-периода, активность митотических CDK возрастает и начинается митоз. Затем, для завершения митоза необходима деградация (протеолиз с участием 26S-протеасом) митотических CYCA1, CYCB1 и CYCB2 классов. Эти CYC содержат специфическую последовательность аминокислотных остатков

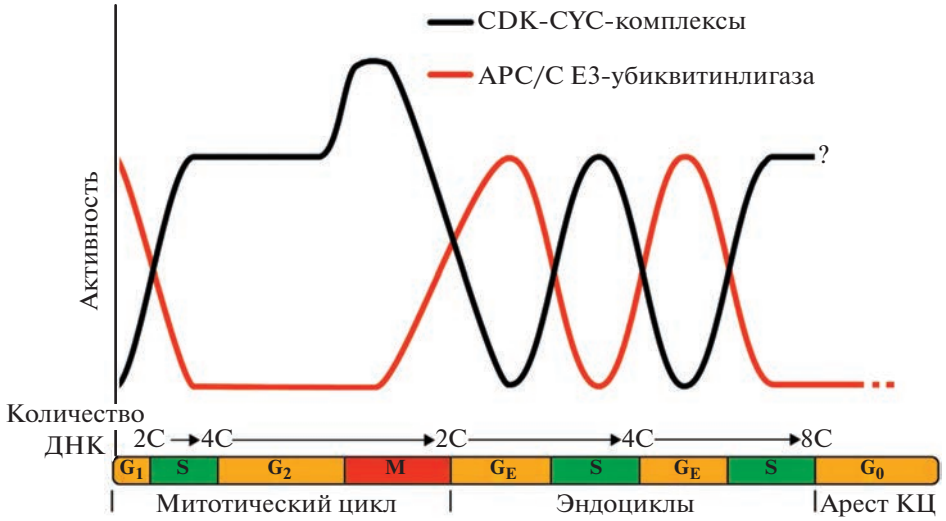


Рис. 3. Схема регуляции МЦ и эндоциклов. В G_1 активность CDK возрастает за счет повышения уровня необходимых для этого CYC, достигая порога достаточного для запуска **S**-периода. Далее возрастает активность митотических CDK и начинается митоз. Завершает митоз деградация (протеолиз с участием 26S-протеасом) митотических CYC, вследствие чего активность CDK падает до уровня раннего G_1. При эндоциклах активность CDK не достигает уровня необходимого для запуска митоза, при этом сохраняется активность CDKA;1 в комплексах с CYC D-типа и CYCA3, что обеспечивает прохождение **S**-периода. Сменяющие друг друга G_E- и **S**-периоды эндоциклов заканчиваются падением активности APC/C. Клетка переходит в пролиферативный покой (G_0) (по Breuer et al. [41] с модификациями).

(D-box, от destruction box), определяющую чувствительность к убиквитинированию и узнаваемую APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome) E3 убиквитинлигазой, что ведет к присоединению убиквитина и быстрой протеолитической деградации митотических CYC [28]. Вследствие этого активность CDK опять падает до уровня раннего G_1-периода (рис. 3).

В **M**-периоде параллельно сегрегации хромосом идет подготовка к физическому разделению двух дочерних клеток (цитокинезу). Несмотря на относительную непродолжительность **M**-периода (2–3 ч), его реализация в высшей степени скоординирована и вовлекает огромное число молекулярных участников и событий, приводящих к значительным, в том числе и видимым структурным перестройкам клетки (конденсация хроматина, формирование веретена деления, разрушение ядерной оболочки, сегрегация хромосом, образование фрагмопласта и т.д.) [37, 38].

Клетки могут покинуть МЦ и перейти в состояние G_0 (пролиферативный покой), характерное для дифференцированных, стареющих и стволовых клеток (рис. 2), поскольку, как уже отмечалось, в целом растении рост и пролиферация клеток должны быть согласованы. Следствие такой взаимозависимости – разные модификации КЦ, наиболее подходящие для конкретных стадий развития и физиологических потребностей определенных типов тканей или клеток [39]. Одной из наиболее распространенных модификаций КЦ является эндоредупликация (синонимы: эндорепликация, эндоциклы, эндоплоидизация), при которой происходят множественные раунды репликации ДНК без последующей сегрегации хромосом и цитокинеза [17, 32, 40, 41]. Эндоредупликация обычно наблюдается в больших, метаболически активных или очень специализированных клетках, хотя встречается и в клетках, не совпадающих с этим описанием.

Эндоредупликационные циклы представляют собой модифицированные МЦ, в которых изменены стадии репликации ДНК и митоза. Важно, что при эндоциклах активность CDK не достигает уровня необходимого для запуска митоза (рис. 3). Это происходит за счет снижения транскрипции предмитотических и митотических *CYCA*, *CYCB* и *CDKB*, а также снижения активности CDKB под влиянием ингибиторов семейства SMR, при этом сохраняется активность CDKA;1 за счет формирования комплексов с CYC D-типа и CYCA3, что обеспечивает прохождение **S**-периода [34, 40]. Эндоциклы состоят из сменяющих друг друга специфичных G_E- и **S**-периодов (рис. 3), при этом наблюдается осцилляция в противофазе активностей CYC–CDK комплексов и убиквитинлигазы APC/C. По завершении эндоциклов активность APC/C падает, что позволяет клетке перейти в состояние пролиферативного покоя – G_0; наличие и активность CYC–CDK комплексов при этом остается не ясным аспектом [41].

Оказалось, что такая протеинкиназа как CDKG2 позитивно влияет на эндоредупликацию, при этом CDKB1;1 непосредственно фосфорилиру-

ет CDKG2 и уменьшает ее стабильность. Молекулярный механизм действия CDKG2 пока не ясен [42]. Нестабильность пластидного генома, вызванная мутациями *reca1why1why3* или ципрофлоксацином, также индуцирует эндоциклы. Сигнал идет через SOG1 (ТФ, отвечающий на повреждения ДНК) и приводит к активации *SMR5* и *SMR7* [43]. Интересно, что SOG1 задействован и при индукции эндоредупликации у *A. thaliana*, вызванной сильным засолением [44]. В этих условиях развивается окислительный стресс, образуются разрывы в двухцепочечной молекуле ДНК, активируется SOG1, что приводит к изменению уровня матриц и белков – снижению CDKB1;1, CDKB2;1 и CYCB1;1 и одновременному повышению WEE1, CCS52A (активатор APC/C) и E2Fa.

Для растений миксоплоидия (эндополиплоидия), то есть присутствие в одной ткани клеток с разным содержанием ДНК – широко распространенное явление [45]. Так, например, популяция клеток эпидермы листа *A. thaliana* миксоплоидна [46] и у экотипа Col-0 содержит ядра с количеством ДНК 2***C*** (36%), 4***C*** (48%), 8***C*** (15%) и 16***C*** (1%) (рис. 4).

В настоящее время физиологическое значение эндополиплоидии еще не совсем понятно и в связи с этим интенсивно исследуется. Возможно, эндополиплоидизация представляет собой способ ускорения роста растений в конкретных экологических условиях, поскольку существует определенная зависимость между количеством ядерной ДНК и размером клеток [46, 47]. Для культивируемых *in vitro* клеток миксоплоидия также широко распространенное явление, которое может определяться как специфическими условиями культивирования (компоненты питательной среды, температура и др.), так и плоидностью исходного экспланта.

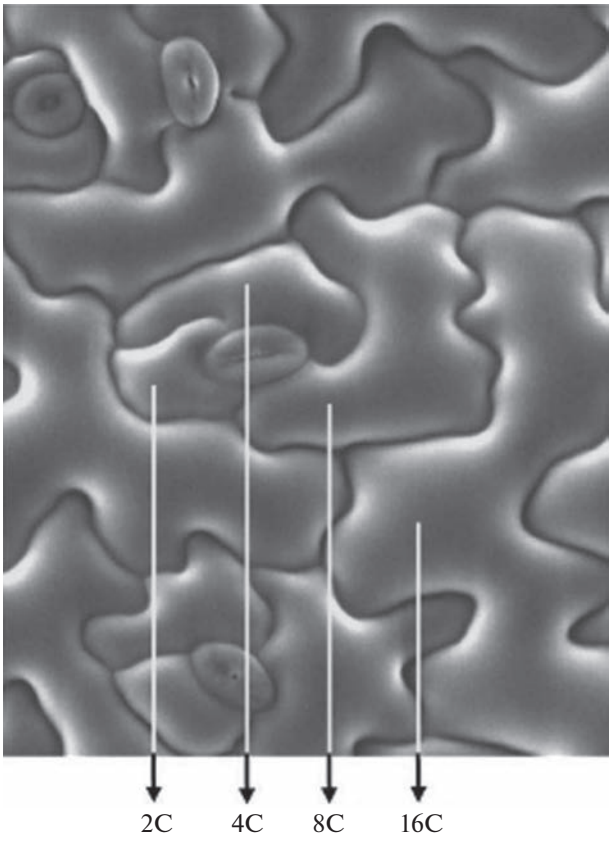


Рис. 4. Миксоплоидия эпидермы листа *A. thaliana* (L.) Heynh. Микрофотография Bénédicte Desvoyes (по Gutierrez [113] с модификациями).

ВНЕШНИЕ ФАКТОРЫ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА РАСТЕНИЙ

Высшие растения обладают эукариотическим типом КЦ. Это означает, что работа генетически обусловленной программы модулируется внешними факторами и стимулами. Внешние факторы, такие как доступность воды, элементы питания, CO_2, свет и температура влияют на рост и деление клеток [48]. Однако изменения в КЦ не всегда приводят к изменениям в размере органов растения. Так, на молодых проростках *A. thaliana* показано, что нитрат индуцирует экспрессию гена *SMR1/LGO* (ингибитор CDK) уже через 3 дня после прорастания, что приводит к индукции эндоредупликации, увеличению количества ДНК и размера клеток. У мутантных растений *lgo-2*, клетки которых неспособны поддерживать активную эндоредупликацию, размер семядолей сходен с таковым растений дикого типа, что достигается за счет деления клеток [49].

При водном дефиците замедляется скорость деления клеток, уменьшаются размеры меристем, число клеток листьев, возрастает доля клеток, находящихся в $\mathbf{G_1}$-периоде, что указывает на увеличение его продолжительности и/или на остановку КЦ на границе $\mathbf{G_1/S}$. При этом продолжительность **S**- $\mathbf{G_2}$- и **M**-периодов изменяется в меньшей степени [48]. Водный дефицит у многих видов растений приводит к остановке как МЦ, так и эндоциклов за счет снижения активности CDK, хотя эндоредупикация может стимулироваться при слабом водном стрессе. Например, в клетках мезофилла *A. thaliana* это позволяет растению поддерживать площадь листа при засухе через опосредованное плоидностью увеличение размеров клеток [17]. Засуха быстро индуцирует в молодых листьях арабидопсиса высокий уровень транскриптов генов *SMR* и *KRP* – ингибиторов CDK и ингибирует экспрессию *CDKA/B* и *CYC* [50].

Повышение концентрации CO_2 ускоряет рост многих видов растений, видимо это определяется повышением продуктивности фотосинтеза и, следовательно, концентрации углеводов [51, 52]. При

этом увеличение размеров листьев и корней связано с увеличением доли делящихся клеток в меристемах.

Первое кардинальное изменение, с которым встречается этиолированный проросток при выходе на поверхность почвы – это свет. Здесь следует напомнить классические данные о том, что освещение этиолированных проростков вызывает волну делений [53]. Например, уже через 6 ч освещения 3-дневных этиолированных проростков *A. thaliana* наблюдается скоординированное увеличение экспрессии генов, связанных с трансляцией, а затем генов – регуляторов КЦ, вовлеченных как в переход от $\mathbf{G_1}$ к **S**-фазе, так и от $\mathbf{G_2}$ к митозу и падение экспрессии генов ингибиторов CDK [54].

Снижение интенсивности падающего света вызывает уменьшение финального числа клеток в листьях двудольных растений [48]. При этом сходный эффект наблюдали когда интенсивность света уменьшали на 40% с помощью нейтральных светофильтров либо закрывали эквивалентную площадь фотосинтезирующей поверхности листа. Оба эти воздействия уменьшают относительную скорость деления клеток и не влияют на продолжительность пролиферативной активности листа. Уменьшение количества поглощенного света сопровождается снижением фотосинтеза и содержания сахаров в тканях листа [48]. Интересен недавно установленный факт – CDKA в *A. thaliana* независимо от КЦ контролирует индуцированный светом тропизм и движения хлоропластов, вероятно, влияя на организацию цитоскелета. Для выполнения такой функции требуется низкая активность CDKA в сравнении с ее активностью в МЦ [55].

Среди переменных факторов окружающей среды, продолжительность световой фазы является более предсказуемой и имеет фиксированный циклический характер. Длительность светового периода контролирует рост и развитие растений, обеспечивая через работу внутренних светозависимых циркадных часов регуляцию экспрессии многих генов. Циркадные часы модулируют время КЦ посредством ритмического связывания ТФ – TOC1/PRR1 (TIMING OF CAB EXPRESSION1/PSEUDO RESPONSE REGULATOR 1) с промотором гена *CDC6* – одного из компонентов пререпликативного комплекса [56].

Исследования влияния спектральных характеристик света на КЦ интенсивно проводятся на одноклеточных зеленых водорослях. Показано, что свет в синей области спектра (400–500 нм) ингибирует деление клеток *Protosiphon botryoides* через сигнал, передаваемый от пока еще не идентифицированного фоторецептора [57], а красный свет стимулирует деление клеток *Chlamydomonas reinhardtii* [58]. Непрерывный дальний красный свет устраняет негативное действие непрерывного синего света на синхронные деления в суспензионной культуре клеток табака, что связывают с фитохром-индуцированным биосинтезом ауксина [59]. Свет, в целом, способствует пролиферации клеток, стимулируя активность фоторецепторов, что приводит к подавлению активности ингибиторов КЦ. Свет влияет и на эндоредупликацию, подавляет эндоциклы. Например, в гипокотилях *A. thaliana*, *Brassica oleracea* и *Pisum sativum*, в темноте проходит больше эндоциклов [60].

Наиболее исследованный фактор внешней среды, влияющий на КЦ – это температура. Множество данных показывает, что продолжительность всего КЦ уменьшается (следовательно, скорость деления клеток увеличивается) с повышением температуры [48]. Однако, не смотря на изменения в скорости деления клеток, окончательное число клеток в органе не изменяется в широких температурных пределах. Фактически увеличение скорости деления клеток при повышении температуры компенсируется уменьшением продолжительности периода пролиферации клеток [61]. Показано, что замедление роста при низкой температуре – результат пропорционального увеличения продолжительности периодов КЦ, причем при минимальной постоянной температуре морфологические характеристики меристемы не изменяются. Предложено понятие критических температурных точек, на основе которых определяется оптимальная температура для КЦ [62].

ФИТОГОРМОНЫ – РЕГУЛЯТОРЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА РАСТЕНИЙ

В качестве внутриклеточных плейотропных факторов, контролирующих практически все процессы в клетках растений, рассматривают фитогормоны. При этом, чтобы показать эффект того или иного фитогормона, как правило, применяют их экзогенно. Действие фитогормонов на рост и развитие растений, в том числе и на пролиферацию клеток, зависит от органа и ткани, стадии онтогенеза, эндогенного соотношения фитогормонов, светового режима и т.п. Все это может изменять направленность действия фитогормонов [63]. В настоящее время убедительно показано, что фитогормоны могут влиять на одни и те же процессы, однако, парадоксально, но их сигнальные пути работают не избыточно. Современная парадигма определяет, что сигналы разных фитогормонов интегрируются на уровне генной сети, а их проведение сопряжено с “общением” (cross-talk) сигнальных путей [64–66].

Ауксины и цитокинины – важнейшие регуляторы клеточного цикла

Участие ауксинов и цитокининов (ЦК) в регуляции КЦ – наиболее исследуемая тема. У *A. thaliana* показана ключевая роль ауксина в формировании

боковых корней. Концентрация ауксина значительно повышается в инициальных клетках перицикла, что приводит к индукции делений этих клеток, формированию примордия и развитию активной меристемы, которая в дальнейшем формирует боковой корень [67].

На растениях *A. thaliana* было показано, что ауксины (природный и синтетические) индуцируют транскрипцию гена *CDKA;1* в апексах корня, тогда как ЦК – в зоне растяжения [68]. Ауксин способствует делению клеток в меристеме корня и имеет максимальную концентрацию в покоящемся центре, где он синтезируется, высокую концентрацию в пролиферативном домене и относительно низкую в зоне растяжения и дифференциации клеток. При этом применение низких концентраций ауксина (200 нМ ИУК) стимулирует митотическую активность, что приводит к увеличению меристематической зоны [65]. Кроме того, двойной мутант с потерей функций генов биосинтеза ауксина *WEI8/TAA1* и *TAR2* (*wei8tar2*) не имеет идентифицируемой меристемы, а обработка ИУК частично ее восстанавливает [69]. В переходном домене апекса корня, где клетки меняют обычный МЦ, заканчивающийся сегрегацией хромосом и цитокинезом, на циклы эндоредупликации – любые нарушения в биосинтезе, транспорте или передаче сигнала ауксина, способствуют переходу от МЦ к эндоциклам, тогда как повышение уровня ауксина задерживает начало эндоциклов и переход в зону растяжения клеток [65].

Достаточно высокий базальный уровень транскриптов и белка CDKA;1 обнаруживается во всех живых клетках растений, даже не активно делящихся [68], что, по-видимому, отражает их уникальную способность – возвращаться к делению. Ауксин определяет возможность деления клеток, стимулируя накопление достаточной концентрации CDKA;1, которая после взаимодействия с определенными CYCD и CYCA обеспечит своей активностью прохождение контрольной точки $\mathbf{G_1/S}$ и собственно **S**-периода КЦ (см. рис. 1, 2).

На пролиферацию клеток в меристеме корня ЦК оказывают негативное влияние. Уменьшение синтеза ЦК и/или нарушение передачи сигнала приводит к увеличению меристематической зоны и задержке начала эндоредупликации [65]. Нельзя не отметить, что существует другой взгляд на механизм действия ЦК в меристематичекой зоне корня. Показано, что *транс*-зеатин замедляет скорость роста корней и переход клеток к растяжению, удлиняя МЦ. Иными словами, любые изменения концентрации эндогенных ЦК или изменения в передаче сигнала ЦК влекут за собой изменения продолжительности МЦ [70]. Тем не менее, доминирующим является представление о том, что ЦК оказывают противоположное влияние на МЦ в апикальных меристемах побегов и корней [71].

Наряду с апикальной меристемой корня, культивируемые *in vitro* протопласты и клетки растений – часто используемые системы в исследованиях роли ауксинов и ЦК в регуляции КЦ. На протопластах из клеток листа люцерны продемонстрировано, что число делящихся клеток зависит от концентрации ауксина [72]. Однако ЦК (зеатин) был необходим для нормального прохождения **S**-периода и завершения митоза, что выражалось в повышении активности соответствующих CDK, а именно CDKA;1 и CDKB1;1. В отсутствие ЦК белок CDKA;1 синтезировался, но не проявлял фосфорилирующей активности [72]. Совместное действие ЦК и ауксина значительно усиливало транскрипцию *CDKA;1* в культивируемых протопластах мезофилла табака [68]. Исследование на суспензионной культуре клеток *A. thaliana* эффектов ауксина (НУК), ЦК (кинетина) и/или сахарозы показало, что экспрессия генов, кодирующих компоненты регуляторной сети КЦ отвечает различным образом в зависимости от сочетания эффекторов [73]. Экспрессия *CDKA;1*, *CYCA2;1* и *CYCD* индуцировалась сахарозой, *CYCD3;1* – кинетином и сахарозой, в то время как экспрессия *CDKB1;1* и *CYCB1;1* существенно повышалась при одновременном действии НУК и кинетина. Уровень транскриптов генов ингибиторов CDK, семейства *KRP* значительно снижался под влиянием фитогормонов и сахарозы [73].

Коллективный эффект ауксина и ЦК наблюдали и в экспериментах с эксплантами листьев люцерны. Обработка листовых эксплантов 2,4-Д несколько повышала общую активность CDK, определяемую по фосфорилированию гистона H1, а комбинация ЦК и ауксина значительно увеличивала активность CDK [74]. Представленные данные показывают, что в указанных объектах ЦК необходим для прохождения **S**-фазы и перехода $\mathbf{G_2/M}$. Более того, вероятно сигнал ЦК важен и для перехода между всеми фазами КЦ, поскольку в синхронизированной суспензионной культуре клеток табака (BY-2) наблюдается осцилляция внутриклеточной концентрации эндогенных ЦК (в основном, в форме *транс*-зеатина) с максимумом перед границей $\mathbf{G_1/S}$ и пиками перед границами $\mathbf{S/G_2}$, $\mathbf{G_2/M}$, и $\mathbf{M/G_1}$ [75].

Ответ целых растений на экзогенные фитогормоны сложен и, в частности, зависит от органа и ткани и не обязательно повторяет ответ культивируемых *in vitro* клеток. Но наряду с культурой клеток, обработка проростков *A. thaliana* зеатином вызывала повышение уровня мРНК *CYCD3* в коммитированных к делению тканях растений [76]. Сверхэкспрессия *CYCD3;1* в трансгенных растениях увеличивает митотическую активность и уменьшает число эндоциклов. В культуре клеток сверхэкспрессия *CYCD3;1* приводит к удлинению G2-фазы и задержке активации митотических генов, что поз-

воляет предположить, что CYCD3;1 обеспечивает формирование комплексов CDKA;1–CYCD, необходимых для перехода из $\mathbf{G_1}$- в **S**-период и активации экспрессии **S**-фазных генов [77]. Интересно, что у мутантных растений *A. thaliana* с высоким содержанием эндогенных ЦК отмечено трехкратное увеличение уровня мРНК *CYCD3* по сравнению с растениями дикого типа, а из эксплантов трансгенных растений *A. thaliana* с конститутивной экспрессией *CYCD3* можно получать каллусные ткани и поддерживать их пролиферацию без экзогенных ЦК [76].

Ауксины и ЦК влияли на экспрессию генов *CYC*, *CDK* и ингибиторов CDK и в других экспериментальных системах. Через 1 сутки культивирования на среде, индуцирующей каллусообразование (среда с 2,4-Д), в эксплантах гипокотилей 5-недельных растений *A. thaliana* повышалась экспрессия многих генов, связанных с КЦ, в том числе *CYCB1;1*, *CYCB2;2*, а уровень транскриптов *KRP1* и *SMR2* (ингибиторов CDK) снижался [78]. Аналогичным образом, обработка проростков *A. thaliana* ауксинами и ЦК приводила к снижению транскрипции гена *KRP4* [79].

Кроме того, ауксины и ЦК реализуют и другие способы контроля КЦ. Ауксины стабилизируют уровень белка E2Fb, который регулирует прохождение **S**- и **M**-периодов, активируя экспрессию *CDKA;1* и *CDKB1;1*. При высоком уровне E2Fb сокращается продолжительность КЦ [80]. Показано, что F-box белок SKP2A (S-Phase Kinase-Associated Protein 2A) *A. thaliana*, контролирующий стабильность E2Fc/DPB – репрессоров транскрипции генов, регулирующих КЦ, способен напрямую связываться с ауксином, что приводит к убиквитинированию и протеолизу SKP2A вместе с его мишенями – E2Fc/DPB, и это положительно сказывается на продвижении КЦ [81]. То есть, можно говорить о возможности регуляции КЦ ауксином, в обход классического модуля его сигналинга – Aux/IAA-ARF-SCFTIR1/AFB [82]. В связи с этим, следует отметить, что ауксин-связывающий белок ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN 1) – один из первых охарактеризованных белков, с большой аффинностью связывающий ауксин и отвечающий критериям рецептора, открывает свои функции в регуляции КЦ. На культуре клеток табака BY-2 показано, что инактивация ABP1 вызывает арест КЦ в $\mathbf{G_1}$-периоде и резкое падение экспрессии *CYCD3;1* [83]. Кроме того, сообщалось, что ауксин через трансмембранные киназы активирует передачу сигнала по MAPK-каскаду (Mitogen-Activated Protein Kinase) и контролирует ориентацию клеточных делений при формировании боковых корней [84].

В переходной зоне апекса корня *A. thaliana* ЦК активирует два ТФ, ARR1 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1) и ARR12, что приводит к индукции SHY2/IAA3 – репрессоров передачи сигнала ауксина. Это ингибирует ауксиновый сигналинг и снижает экспрессию переносчиков ауксина, что приводит к остановке деления клеток [71]. Однако ЦК может оказывать прямое влияние на КЦ, которое не определяется действием на передачу сигнала ауксина. Показано, что активированный ЦК ARR2 напрямую связывается с промотором гена *CCS52A1* и индуцирует его экспрессию. Белок CCS52A1 – активатор APC/C E3 убиквитинлигазы экспрессируется в переходной зоне и зоне растяжения корня и стимулирует деградацию митотических циклинов, что приводит к запуску эндоциклов [85].

Но для апикальной меристемы побега *A. thaliana* недавно было обнаружено, что при переходе $\mathbf{G_2/M}$ ЦК способствует перемещению в ядро ТФ MYB3R4, который активирует экспрессию митотических генов, контролирующих “плановое” прохождение митоза и цитокинеза (см. рис. 1). Быстрое накопление MYB3R4 в ядре зависит от белков импортинов и совпадает с транзиторным пиком концентрации ЦК [86]. Появляются и новые игроки в реализации сигнала ЦК. Так, было показано, что CKG (CYTOKININ-RESPONSIVE GROWTH REGULATOR), известный как ТФ bHLH137, контролирует МЦ и рост клеток, работает после ARR2, индуцируя транскрипцию *WEE1* [87].

Абсцизовая кислота, гиббереллины и брассиностероиды – ингибиторы и стимуляторы клеточного цикла

Давно обнаружено неоднозначное действие АБК на пролиферацию клеток. Наряду с проявлением ингибирующего эффекта в некоторых системах АБК стимулировала рост, деление клеток и синтез ДНК. Как и для многих фитогормонов, это определяется концентрацией АБК и чувствительностью тканей и клеток растения [88]. Безусловным фаворитом в объяснении негативного влияния АБК на КЦ является тот факт, что под ее влиянием увеличивается экспрессия генов *KRP/ICK*, кодирующих ингибиторы CDKA. Это приводит к нарушению перехода $\mathbf{G_1/S}$. Кроме того, АБК подавляет экспрессию *CYCB1;1* (контрольная точка $\mathbf{G_2/M}$) [89]. АБК способствует увеличению размеров клеток эпидермы листа *A. thaliana* у растений, не испытывающих водный стресс, что связано со стимуляцией эндоредупликации [90].

Обработка апекса корня низкой концентрацией АБК (0.5 μM) увеличивает размер меристемы, тогда как высокая концентрация (30 μM) приводит к противоположному результату [65]. Интересно, что отрицательный эффект АБК на размер меристемы можно частично устранить при совместной обработке с глутатионом. Вероятно, в реализации такого эффекта АБК участвуют АФК [65].

Любопытно, но обработка АБК надземной части растений *A. thaliana* приводит к увеличению размера меристемы корня и индуцирует экспрессию *CYCB1;1::GFP* (маркер митоза). Предполагается, что это вызвано усилением базипетального транспорта ауксина [91]. Совсем недавно был обнаружен новый регуляторный модуль, в котором ТФ ABI4 напрямую ингибирует активность промоторов как минимум двух основных генов клеточного цикла, *CYCB1;1* и *CDKB2;2* [92].

Хорошо известно, что этилен и АБК взаимно влияют на синтез друг друга и существуют пункты "общения" путей передачи их сигналов. Тем не менее, неожиданным был результат, полученный на суспензионных культурах клеток *A. thaliana* дикого типа (Col-0) и мутантов по одному из рецепторов этилена, *etr1-1* и следующему за рецепторами компоненту передачи сигнала, *ctr1-1* (*constitutive triple response1-1*), у которого сигнальный путь этилена постоянно работает. Для клеток дикого типа экзогенная АБК выполняет функцию ингибитора синтеза ДНК и пролиферации клеток. Если этиленовый сигнал не воспринимается в полной мере (*etr1-1*), то АБК значительно усиливает пролиферацию клеток. Когда путь передачи сигнала этилена конститутивно активен (*ctr1-1*), клетки чаще переходят к эндоредупликации, но добавление АБК способствует реактивации МЦ [93].

Гиббереллины играют значительную роль в координации роста и пролиферации клеток в условиях нормальной гравитации, что не работает в условиях микрогравитации [94]. В меристеме корней гиббереллины необходимы как для прохождения МЦ, так и для роста клеток в зоне элонгации; стимулируя разрушение репрессирующих рост белков DELLA [65]. В семенах *A. thaliana* гиббереллин GA4 индуцирует экспрессию *CYCD1;1* и нескольких факторов репликации ДНК. Во время вегетативного роста белки DELLA ингибируют пролиферацию клеток, индуцируя экспрессию ингибиторов КЦ – *SMR1*, *SMR2* и *KRP2*. В ответ на осмотический стресс DELLA индуцируют клеточную дифференциацию и начало эндоредупликации в листьях за счет подавления активности генов, кодирующих ингибиторы APC/C [95].

Брассиностероиды, как правило, выступают в роли позитивных регуляторов КЦ [96]. Эпибрассинолид повышает экспрессию *CYCD3;1* и тем самым усиливает интенсивность деления клеток и может заменить ЦК в каллусной и суспензионной культурах клеток *A. thaliana* [97]. При этом, для клеток листа *A. thaliana* брассиностероиды важны для процессов деления, растяжения и дифференциации. Баланс между пролиферацией и дифференциацией клеток зависит от концентрации фитогормона и функционирования BRI1-зависимой (рецептор брассиностероидов) сигнальной системы [98]. В апикальной меристеме корня эффект брассиностероидов также зависит от концентрации. Растения, обработанные 0.4–4 нМ брассинолида, имеют более короткую меристему, чем необработанные растения, в то время как 0.04 нМ фитогормона увеличивает размер меристематической зоны. При этом влияние брассиностероидов на пролиферацию или дифференциацию зависит от типа клеток; в эпидерме – индукция пролиферации, в стеле – стимуляция дифференциации [65].

Этилен ингибирует или стимулирует пролиферацию клеток?

В вегетативном росте этилен, по-видимому, играет двойную роль, стимулируя и ингибируя рост, в зависимости от вида, ткани и типа клеток, стадии развития, гормонального статуса и условий окружающей среды [64]. Когда этилен рассматривают как "гормон стресса", иного, чем затопление, он исправно исполняет функции ингибитора растяжения и деления клеток, в частности в тканях листа, что имеет важное адаптивное значение [50].

В настоящее время нет однозначного понимания роли этилена в контроле КЦ. Показано, что этилен ингибирует репликацию ядерной ДНК и деление клеток в проростках гороха [99], индуцирует запрограммированную гибель культивируемых клеток табака в определенные периоды КЦ, при концентрациях (17700–35000 мкл/л), превышающих на три-четыре порядка физиологические [100]. Этилен ингибирует пролиферацию клеток в меристеме корня *A. thaliana*, в частности, активируя экспрессию *KRP1* [101]. При этом показано, учитывая способность ЦК индуцировать биосинтез этилена и отрицательное влияние ЦК на пролиферацию клеток меристемы корня, что этилен лишь отчасти способствует, но не требуется для проявления эффектов ЦК. Однако этилен подавляет стимулирующее влияние ЦК на деление клеток и рост семядолей этиолированных проростков *A. thaliana* [102].

Тем не менее, этилен может оказывать положительное влияние на события КЦ. Этилен активирует синтез ДНК и эндоредупликацию, но ингибирует цитокинез в эпидерме гипокотилей огурца [103]. Этилен индуцирует деление клеток покоящегося центра меристемы корней *A. thaliana* [104] и клеток эпидермы этиолированных гипокотилей огурца после кратковременного воздействия [105]. Этилен активирует пролиферацию камбиальных клеток тополя [106] и клеток покоящегося центра меристемы корней кукурузы после удаления кончика корня [107]. Этилен в кооперации с рецепторной киназой PXY способствует увеличению скорости делений в "васкулярной" меристеме при формировании флоэмы [108]. На культивируемых клетках *A. thaliana* дикого типа Col-0 и мутанта *etr1-1*, несущего точечную мутацию в сайте связывания этилена рецептором ETR1 (один из пя-

ти рецепторов) показано, что ингибитор связывания этилена с рецепторами (1-метилциклопропен, 1-MCP) значимо снижает, а этилен повышает жизнеспособность клеток обоих генотипов, аналогичным образом влияя на индексы роста. Этилен существенно увеличивает число **S**-фазных клеток в культуре *etr1-1*, а 1-MCP – снижает. Вероятно, за контроль пролиферации клеток отвечает не ETR1, а другие рецепторы этилена [109]. Экзогенный этилен стимулирует переход в **S**-фазу культивируемых клеток *A. thaliana* лишь тогда, когда продукция эндогенного этилена мала. Кроме того, показана значительная корреляция между продукцией этилена и скоростью роста нескольких штаммов суспензионных культур клеток. При этом синтез этилена, по-видимому, предшествует пролиферации клеток [110].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отметим, что в данной лекции мы не рассматривали влияние жасмонатов, стриголактонов и каррикинов на КЦ. В основном из-за ограниченного объема. С другой стороны, жасмонаты, стриголактоны и каррикины в большей степени молекулы стресса и, вероятно, необходимо рассказать об их влиянии на КЦ отдельно. Тем не менее, если суммировать изложенные выше данные, то становится ясным, что консервативная молекулярная механика КЦ все же продолжает пополняться новыми ТФ, новой ролью аннотированных ранее CYC и CDK и т.д. Что касается влияния фитогормонов на КЦ, то очевидно, что эффекты зависят от органа, ткани, внешних условий, градиентов других фитогормонов и т. п. Не существует идеальной абстрактной клетки и стандартного влияния того или иного фитогормона применительно к этой клетке. Культивируемые *in vitro* клетки также не лишены эпигенетического ландшафта исходного экспланта. Используют ли разные клетки общие или уникальные инструменты регуляции КЦ? Вопрос остается открытым.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wilson E.B.* The Cell in Development and Inheritance. New York: Macmillan, 1911. 483 p.
2. *Vercruysse J., Baekelandt A., Gonzalez N., Inzé D.* Molecular networks regulating cell division during *Arabidopsis* leaf growth // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. P. 2365. https://doi.org/10.1093/jxb/erz522
3. *Ivanov V.B., Dubrovsky J.G.* Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions // Trends Plant Sci. 2013. V. 18. P. 237. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.002
4. *Sablowski R.* Coordination of plant cell growth and division: collective control or mutual agreement? // Curr. Opin. Plant Biol. V. 34. P. 54. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.09.004
5. *Howard A., Pelc S.R.* Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage // Heredity (Edinb.) Suppl. 1953. V. 6. P. 261.
6. *Swift H.H.* The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1950. V. 36. P. 643. https://doi.org/10.1073/pnas.36.11.643
7. *Greilhuber J., Dolezel J., Lysák M.A., Bennett M.D.* The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents // Ann. Bot. V. 95. P. 255. https://doi.org/10.1093/aob/mci019
8. *Kejnovsky E., Leitch I.J., Leitch A.R.* Contrasting evolutionary dynamics between angiosperm and mammalian genomes // Trends Ecol. Evol. 2009. V. 24. P. 572. https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.04.010
9. *Pellicer J., Fay M.F., Leitch I.J.* The largest eukaryotic genome of them all? // Bot. J. Linn. Soc. 2010. V. 164. P. 10. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01072.x
10. *Bechhoefer J., Rhind N.* Replication timing and its emergence from stochastic processes // Trends Genet. 2012. V. 28. P. 374. https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.011
11. *Greenberg A., Simon I.* S phase duration is determined by local rate and global organization of replication // Biology. 2022. V. 11. 718. https://doi.org/10.3390/biology11050718
12. *Lehti-Shiu M.D., Shiu S.-H.* Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily // Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 2012. V. 367. P. 2619. https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0003
13. *Cross F., Roberts J., Weintraub H.* Simple and complex cell cycles // Annu. Rev. Cell Biol. 1989. V. 5. P. 341. https://doi.org/10.1146/annurev.cb.05.110189.002013
14. *Satyanarayana A., Kaldis P.* Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms // Oncogene. 2009. V. 28. P. 2925. https://doi.org/10.1038/onc.2009.170
15. *Van’t Hof J.* The regulation of cell division in higher plants // Brookhaven Symp. Biol. 1973. V. 25. P. 152.
16. *Polyn S., Willems A., De Veylder L.* Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 23. P. 1. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.09.012
17. *Scholes D.R., Paige K.N.* Plasticity in ploidy: a generalized response to stress // Trends Plant Sci. 2015. V. 20. P. 165. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.007
18. *Carneiro A.K., Montessoro P.D.F., Fusaro A.F., Araújo B.G., Hemerly A.S.* Plant CDKs – driving the cell cycle

through climate change // Plants. 2021. V. 10. 1804. https://doi.org/10.3390/plants10091804

19. *Sablowski R., Gutierrez C.* Cycling in a crowd: coordination of plant cell division, growth, and cell fate // Plant Cell. 2022. V. 34. P. 193. https://doi.org/10.1093/plcell/koab222
20. *Blomme J., Inzé D., Gonzalez N.* The cell-cycle interactome: a source of growth regulators? // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 2715. https://doi.org/10.1093/jxb/ert388
21. *Van Leene J., Hollunder J., Eeckhout D., Persiau G., Van De Slijke E., Stals H., Van Isterdael G., Verkest A., Neirynck S., Buffel Y., De Bodt S., Maere S., Laukens K., Pharazyn A., Ferreira P.C.G., et al.* Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Syst. Biol. 2010. V. 6. 397. https://doi.org/10.1038/msb.2010.53
22. *Jia R.-D., Guo C.-C., Xu G.-X., Shan H.-Y., Kong H.-Z.* Evolution of the cyclin gene family in plants // J. Syst. Evol. 2014. V. 52. P. 651. https://doi.org/10.1111/jse.12112
23. *Vandepoele K., Raes J., De Veylder L., Rouzé P., Rombauts S., Inzé D.* Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 903. https://doi.org/10.1105/tpc.010445
24. *Desvoyes B., De Mendoza A., Ruiz-Trillo I., Gutierrez C.* Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 2657. https://doi.org/10.1093/jxb/ert411
25. *Desvoyes B., Gutierrez C.* Roles of plant retinoblastoma protein: cell cycle and beyond // EMBO J. 2020. V. 39. e105802. https://doi.org/10.15252/embj.2020105802
26. *Romeiro Motta M., Zhao X.A., Pastuglia M., Belcram K., Roodbarkelari F., Komaki M., Harashima H., Komaki S., Kumar M., Bulankova P., Heese M., Riha K., Bouchez D., Schnittger A.* B1-type cyclins control microtubule organization during cell division in *Arabidopsis* // EMBO Rep. 2022. V. 23. e53995. https://doi.org/10.15252/embr.202153995
27. *Menges M., De Jager S.M., Gruissem W., Murray J.A.H.* Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control // Plant J. 2005. V. 41. P. 546. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02319.x
28. *Ito M.* Expression of mitotic cyclins in higher plants: transcriptional and proteolytic regulation // Plant Biotechnol. Rep. 2014. V. 8. P. 9. https://doi.org/10.1007/s11816-013-0297-9
29. *Araki S., Ito M., Soyano T., Nishihama R., Machida Y.* Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 32979. https://doi.org/10.1074/jbc.M403171200
30. *Umeda M., Shimotohno A., Yamaguchi M.* Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46. P. 1437. https://doi.org/10.1093/pcp/pci170
31. *Pedroza-Garcia J.A., Xiang Y., De Veylder L.* Cell cycle checkpoint control in response to DNA damage by environmental stresses // Plant J. 2022. V. 109. P. 490. https://doi.org/10.1111/tpj.15567
32. *De Veylder L., Larkin J.C., Schnittger A.* Molecular control and function of endoreplication in development and physiology // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 624. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.07.001
33. *De Veylder L., Beeckman T., Beemster G.T., Krols L., Terras F., Landrieu I., Van Der Schueren E., Maes S., Naudts M., Inzé D.* Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis* // Plant Cell. 2001. V. 13. P. 1653. https://doi.org/10.1105/tpc.010087
34. *Churchman M.L., Brown M.L., Kato N., Kirik V., Hülskamp M., Inzé D., De Veylder L., Walker J.D., Zheng Z., Oppenheimer D.G., Gwin T., Churchman J., Larkin J.C.* SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 3145. https://doi.org/10.1105/tpc.106.044834
35. *Peres A., Churchman M.L., Hariharan S., Himanen K., Verkest A., Vandepoele K., Magyar Z., Hatzfeld Y., Van Der Schueren E., Beemster G.T.S., Frankard V., Larkin J.C., Inzé D., De Veylder L.* Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 25588. https://doi.org/10.1074/jbc.M703326200
36. *Han S.K., Herrmann A., Yang J., Iwasaki R., Sakamoto T., Desvoyes B., Kimura S., Gutierrez C., Kim E.-D., Torii K.U.* Deceleration of the cell cycle underpins a switch from proliferative to terminal divisions in plant stomatal lineage // Dev. Cell. 2022. V. 57. P. 569. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.01.014
37. *Shoaib M., Nair N., Sørensen C.S.* Chromatin landscaping at mitotic exit orchestrates genome function // Front. Genet. 2020. V. 11. 103. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00103
38. *Buschmann H., Müller S.* Update on plant cytokinesis: rule and divide // Curr. Opin. Plant Biol. 2019. V. 52. P. 97. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.07.003
39. *Jakoby M., Schnittger A.* Cell cycle and differentiation // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 661. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.09.015
40. *Maluszynska J., Kolano B., Sas-Nowosielska H.* Endopolyploidy in plants // Plant Genome Diversity. V. 2 / Eds. J. Greilhuber et al. Springer. 2013. P. 99. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4_7
41. *Breuer C., Braidwood L., Sugimoto K.* Endocycling in the path of plant development // Curr. Opin. Plant Biol. 2014. V. 17. P. 78. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.007
42. *Jiang S., Wei J., Li N., Wang Z., Zhang Y., Xu R., Zhou L., Huang X., Wang L., Guo S., Wang Y., Song C.-P., Qian W., Li Y.* The UBP14-CDKB1;1-CDKG2 cascade controls endoreduplication and cell growth in

Arabidopsis // Plant Cell. 2022. V. 34. P. 1308. https://doi.org/10.1093/plcell/koac002

43. *Duan S., Hu L., Dong B., Jin H.L., Wang H.B.* Signaling from plastid genome stability modulates endoreplication and cell cycle during plant development // Cell Rep. 2020. V. 32. 108019. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108019
44. *Mahapatra K., Roy S.* SOG1 transcription factor promotes the onset of endoreduplication under salinity stress in *Arabidopsis* // Sci. Rep. 2021. V. 11. 11659. https://doi.org/10.1038/s41598-021-91293-1
45. *Barow M., Meister A.* Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size // Plant Cell Environ. 2003. V. 26. P. 571. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00988.x
46. *Melaragno J., Mehrotra B., Coleman A.* Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis* // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 1661. https://doi.org/10.1105/tpc.5.11.1661
47. *Sugimoto-Shirasu K., Roberts K.* "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 544. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.09.009
48. *Granier C., Cookson S.J., Tardieu F., Muller B.* Cell cycle and environmental stresses // Cell cycle control and plant development. Annu. Plant Rev. V. 32 / Ed. D. Inzé. Blackwell. 2007. P. 335. https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0346
49. *Moreno S., Canales J., Hong L., Robinson D., Roeder A.H., Gutiérrez R.A.* Nitrate defines shoot size through compensatory roles for endoreplication and cell division in *Arabidopsis thaliana* // Curr. Biol. 2020. V. 30. P. 1988. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.036
50. *Tenorio Berrío R., Nelissen H., Inzé D., Dubois M.* Increasing yield on dry fields: molecular pathways with growing potential // Plant J. 2022. V. 109. P. 323. https://doi.org/10.1111/tpj.15550
51. *Kinsman E.A., Lewis C., Davies M.S., Young J.E., Francis D., Vilhar B., Ougham H.J.* Elevated CO_2 stimulates cells to divide in grass meristems: a differential effect in two natural populations of *Dactylis glomerata* // Plant Cell Environ. 1997. V. 20. P. 1309. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-21.x
52. *Taylor G., Tricker P.J., Zhang F.Z., Alston V.J., Miglietta F., Kuzminsky E.* Spatial and temporal effects of free-air CO_2 enrichment (POPFACE) on leaf growth, cell expansion, and cell production in a closed canopy of poplar // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 177. https://doi.org/10.1104/pp.011296
53. *Maksymowych R.* Analysis of leaf development // Developmental and cell biology / Eds. M. Abercrombie et al. Cambridge University Press. 1973. 109 p.
54. *López-Juez E., Dillon E., Magyar Z., Khan S., Hazeldine S., de Jager S.M., Murray J.A.H., Beemster G.T.S., Bögre L., Shanahan H.* Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis* // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 947. https://doi.org/10.1105/tpc.107.057075
55. *Bao L., Inoue N., Ishikawa M., Gotoh E., Teh O.-K., Higa T., Morimoto T., Ginanjar E.F., Harashima H., Noda N., Watahiki M., Hiwatashi Y., Sekine M., Hasebe M., Wada M., Fujita T.* A PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase controls light responses in land plants // Sci. Adv. 2022. V. 8. eabk2116. https://doi.org/10.1126/sciadv.abk2116
56. *Fung-Uceda J., Lee K., Seo P.J., Polyn S., De Veylder L., Mas P.* The circadian clock sets the time of DNA replication licensing to regulate growth in *Arabidopsis* // Dev. Cell. 2018. V. 45. P. 101. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.02.022
57. *Nishihama R., Kohchi T.* Evolutionary insights into photoregulation of the cell cycle in the green lineage // Curr. Opin. Plant Biol. 2013. V. 16. P. 630. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.07.006
58. *Beel B., Prager K., Spexard M., Sasso S., Weiss D., Müller N., Heinnickel M., Dewez D., Ikoma D., Grossman A.R., Kottke T., Mittag M.* A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 2992. https://doi.org/10.1105/tpc.112.098947
59. *Qiao F., Petrasek J., Nick P.* Light can rescue auxin-dependent synchrony of cell division in a tobacco cell line // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 503. https://doi.org/10.1093/jxb/erp319
60. *Okello R.C.O., de Visser P.H.B., Heuvelink E., Marcelis L.F.M., Struik P.C.* Light mediated regulation of cell division, endoreduplication and cell expansion // Environ. Exp. Bot. 2016. V. 121. P. 39. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.003
61. *Granier C., Tardieu F.* Is thermal time adequate for expressing the effects of temperature on sunflower leaf development? // Plant Cell Environ. 1998. V. 21. P. 695. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00319.x
62. *Grif V.G., Ivanov V.B., Machs E.M.* Cell cycle and its parameters in flowering plants // Tsitologiia. 2002. V. 44. P. 936.
63. *Thimann K.V.* Antagonisms and similarities between cytokinins, abscisic acid and auxin (mini review) // Physiology and biochemistry of cytokinins in plants / Eds. M. Kaminek et al. SPB Academic Publishing. 1992. P. 395.
64. *Van de Poel B., Smet D., Van Der Straeten D.* Ethylene and hormonal cross talk in vegetative growth and development // Plant Physiol. 2015. V. 169. P. 61. https://doi.org/10.1104/pp.15.00724
65. *Zluhan-Martínez E., López-Ruíz B.A., García-Gómez M.L., García-Ponce B., de la Paz Sánchez M., Álvarez-Buylla E.R., Garay-Arroyo A.* Integrative roles of phytohormones on cell proliferation, elongation and differentiation in the *Arabidopsis thaliana* primary root // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. 659155. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.659155
66. *Jiang K., Guo H., Zhai J.* Interplay of phytohormones and epigenetic regulation: a recipe for plant development and plasticity // J. Integr. Plant Biol. 2022. https://doi.org/10.1111/jipb.13384
67. *Péret B., De Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplaze L., Beeckman T., Bennett M.J. Arabidopsis* lateral root development: an emerging story // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 399. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002

68. *Hemerly A.S., Ferreira P., de Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G., Inzé D. cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 1711. https://doi.org/10.1105/tpc.5.12.1711

69. *Brumos J., Robles L.M., Yun J., Vu T.C., Jackson S., Alonso J.M., Stepanova A.N.* Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development // Dev. Cell. 2018. V. 47. P. 306. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.022

70. *Ivanov V.B., Filin A.N.* Cytokinins regulate root growth through its action on meristematic cell proliferation but not on the transition to differentiation // Funct. Plant Biol. 2017. V. 45. P. 215. https://doi.org/10.1071/FP16340

71. *Schaller G.E., Street I.H., Kieber J.J.* Cytokinin and the cell cycle // Curr. Opin. Plant Biol. 2014. V. 21. P. 7. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.015

72. *Pasternak T., Miskolczi P., Ayaydin F., Mészáros T., Dudits D., Fehér A.* Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa // Plant Growth Regul. 2000. V. 32. P. 129. https://doi.org/10.1023/A:1010793226030

73. *Richard C., Lescot M., Inzé D., De Veylder L.* Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures // Plant Cell. Tissue Organ Cult. 2002. V. 69. P. 167. https://doi.org/10.1023/A:1015241709145

74. *Mészáros T., Miskolczi P., Ayaydin F., Pettkó-Szandtner A., Peres A., Magyar Z., Horváth G.V., Bakó L., Fehér A., Dudits D.* Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells // Plant Mol. Biol. 2000. V. 43. P. 595. https://doi.org/10.1023/a:1006412413671

75. *Hartig K., Beck E.* Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells // Plant Biol. 2005. V. 7. P. 33. https://doi.org/10.1055/s-2004-830474

76. *Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacqmard A., Murray J.A.* Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin // Science. 1999. V. 283. P. 1541. https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1541

77. *Menges M., Samland A.K., Planchais S., Murray J.A.H.* The D-Type Cyclin *CYCD3;1* Is Limiting for the G1-to-S-Phase Transition in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 893. https://doi.org/10.1105/tpc.105.039636

78. *Chen C.C., Fu S.F., Lee Y.I., Lin C.Y., Lin W.C., Huang H.J.* Transcriptome analysis of age-related gain of callus-forming capacity in *Arabidopsis* hypocotyls // Plant Cell Physiol. 2012. V. 53. P. 1457. https://doi.org/10.1093/pcp/pcs090

79. *Cho H.-J., Kwon H.-K., Wang M.-H.* Expression of Kip-related protein 4 gene (*KRP4*) in response to auxin and cytokinin during growth of *Arabidopsis thaliana* // BMB Rep. 2010. V. 43. P. 273. https://doi.org/10.5483/bmbrep.2010.43.4.273

80. *Magyar Z., De Veylder L., Atanassova A., Bakó L., Inzé D., Bögre L.* The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 2527. https://doi.org/10.1105/tpc.105.033761

81. *Jurado S., Abraham Z., Manzano C., López-Torrejón G., Pacios L.F., Del Pozo J.C.* The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 3891. https://doi.org/10.1105/tpc.110.078972

82. *Del Pozo J.C., Manzano C.* Auxin and the ubiquitin pathway. Two players-one target: the cell cycle in action // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 2617. https://doi.org/10.1093/jxb/ert363

83. *Sauer M., Kleine-Vehn J.* AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 2033. https://doi.org/10.1105/tpc.111.087064

84. *Huang R., Zheng R., He J., Zhou Z., Wang J., Xiong Y., Xu T.* Noncanonical auxin signaling regulates cell division pattern during lateral root development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 21285. https://doi.org/10.1073/pnas.1910916116

85. *Takahashi N., Kajihara T., Okamura C., Kim Y., Katagiri Y., Okushima Y., Matsunaga S., Hwang I., Umeda M.* Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots // Curr. Biol. 2013. V. 23. P. 1812. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.051

86. *Yang W., Cortijo S., Korsbo N., Roszak P., Schiessl K., Gurzadyan A., Wightman R., Jönsson H., Meyerowitz E.* Molecular mechanism of cytokinin-activated cell division in *Arabidopsis* // Science. 2021. V. 371. P. 1350. https://doi.org/10.1126/science.abe2305

87. *Park J., Lee S., Park G., Cho H., Choi D., Umeda M., Choi Y., Hwang D., Hwang I.* CYTOKININ-RESPONSIVE GROWTH REGULATOR regulates cell expansion and cytokinin-mediated cell cycle progression // Plant Physiol. 2021. V. 186. P. 1734. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab180

88. *Humplík J.F., Bergougnoux V., Van Volkenburgh E.* To stimulate or inhibit? That is the question for the function of abscisic acid // Trends Plant Sci. 2017. V. 22. P. 830. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.009

89. *Sun L.R., Wang Y.B., He S.B., Hao F.S.* Mechanisms for abscisic acid inhibition of primary root growth // Plant Signal. Behav. 2018. V. 13. e1500069. https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1500069

90. *Tanaka Y., Nose T., Jikumaru Y., Kamiya Y.* ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves // Plant J. 2013. V. 74. P. 448. https://doi.org/10.1111/tpj.12136

91. *Xie Q., Essemine J., Pang X., Chen H., Cai W.* Exogenous application of abscisic acid to shoots promotes primary root cell division and elongation // Plant Sci. 2020. V. 292. 110385. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110385

92. *Luo X., Xu J., Zheng C., Yang Y., Wang L., Zhang R., Ren X., Wei S., Aziz U., Du J., Liu W., Tan W., Shu K.* Abscisic acid inhibits primary root growth by impairing ABI4-mediated cell cycle and auxin biosynthesis // Plant Physiol. 2022. https://doi.org/10.1093/plphys/kiac407

93. *Novikova G.V., Stepanchenko N.S., Zorina A.A., Nosov A.V., Rakitin V.Y., Moshkov I.E., Los D.A.* Coupling of cell division and differentiation in *Arabidopsis*

thaliana cultured cells with interaction of ethylene and ABA signaling pathways // Life. 2020. V. 10. 15. https://doi.org/10.3390/life10020015

94. *Shtin M., Dello Ioio R., Del Bianco M.* It's time for a change: the role of gibberellin in root meristem development // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. 882517 https://doi.org/10.3389/fpls.2022.882517
95. *Claeys H., De Bodt S., Inzé D.* Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks // Trends Plant Sci. 2014. V. 19. P. 231. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.001
96. *Oh M.-H., Honey S.H., Tax F.E.* The control of cell expansion, cell division, and vascular development by brassinosteroids: a historical perspective // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. 1743. https://doi.org/10.3390/ijms21051743
97. *Hu Y., Bao F., Li J.* Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis* // Plant J. 2000. V. 24. P. 693. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00915.x
98. *Zhiponova M.K., Vanhoutte I., Boudolf V., Betti C., Dhondt S., Coppens F., Mylle E., Maes S., González-García M., Caño-Delgado A.I., Inzé D., Beemster G.T.S., De Veylder L., Russinova E.* Brassinosteroid production and signaling differentially control cell division and expansion in the leaf // New Phytol. 2013. V. 197. P. 490. https://doi.org/10.1111/nph.12036
99. *Apelbaum A., Burg S.P.* Effect of ethylene on cell division and deoxyribonucleic acid synthesis in *Pisum sativum* // Plant Physiol. 1972. V. 50. P. 117. https://doi.org/10.1104/pp.50.1.117
100. *Herbert R.J., Vilhar B., Evett C., Orchard C.B., Rogers H.J., Davies M.S., Francis D.* Ethylene induces cell death at particular phases of the cell cycle in the tobacco TBY-2 cell line // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 1615. https://doi.org/10.1093/jxb/52.361.1615
101. *Street I.H., Aman S., Zubo Y., Ramzan A., Wang X., Shakeel S.N., Kieber J.J., Schaller G.E.* Ethylene inhibits cell proliferation of the *Arabidopsis* root meristem // Plant Physiol. 2015. V. 169. P. 338. https://doi.org/10.1104/pp.15.00415
102. *Stoynova-Bakalova E., Bakalov D.V., Baskin T.I.* Ethylene represses the promoting influence of cytokinin on cell division and expansion of cotyledons in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings // PeerJ. 2022. V. 10. e14315. https://doi.org/10.7717/peerj.14315
103. *Dan H., Imaseki H., Wasteneys G.O., Kazama H.* Ethylene stimulates endoreduplication but inhibits cytokinesis in cucumber hypocotyl epidermis // Plant Physiol. 2003. V. 133. P. 1726. https://doi.org/10.1104/pp.103.025783
104. *Ortega-Martínez O., Pernas M., Carol R.J., Dolan L.* Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root // Science. 2007. V. 317. P. 507. https://doi.org/10.1126/science.1143409
105. *Kazama H., Dan H., Imaseki H., Wasteneys G.O.* Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl epidermal cells // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1614. https://doi.org/10.1104/pp.103.031088
106. *Love J., Björklund S., Vahala J., Hertzberg M., Kangasjärvi J., Sundberg B.* Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of Populus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 5984. https://doi.org/10.1073/pnas.0811660106
107. *Bystrova E.I., Zhukovskaya N.V., Rakitin V.J. Ivanov V.B.* Role of ethylene in activation of cell division in quiescent center of excised maize roots // Russ. J. Dev. Biol. 2015. V. 46. P. 60. https://doi.org/10.1134/S1062360415020034
108. *Etchells J.P., Provost C.M., Turner S.R.* Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signaling // PLoS Genet. 2012. V. 8. e1002997. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002997
109. *Fomenkov A.A., Nosov A.V., Rakitin V.Y., Mamaeva A.S., Novikova G.V.* Cytophysiological characteristics of *Arabidopsis thaliana* cultivated cells with disable perception of ethylene signal by the ETR1 receptor // Russ. J. Plant Physiol. 2014. V. 61. P. 598. https://doi.org/10.1134/S1021443714050070
110. *Fomenkov A.A., Nosov A.V., Rakitin V.Y., Sukhanova E.S., Mamaeva A.S., Sobol'kova G.I., Nosov A.M., Novikova G.V.* Ethylene in the proliferation of cultured plant cells: regulating or just going along? // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 815. https://doi.org/10.1134/S1021443715060059
111. *Komaki S., Sugimoto K.* Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues // Plant Cell Physiol. 2012. V. 53. P. 953. https://doi.org/10.1093/pcp/pcs070
112. *Velappan Y., Signorelli S., Considine M.J.* Cell cycle arrest in plants: what distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? // Ann. Bot. 2017. V. 120. P. 495. https://doi.org/10.1093/aob/mcx082
113. *Gutierrez C.* The *Arabidopsis* cell division cycle // Arabidopsis Book. 2009. V. 7. e0120. https://doi.org/10.1199/tab.0120