

ISSN 0015-3303

Том 70, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 70, номер 5, 2023

ОБЗОРЫ

Молекулярно-генетические основы устойчивости подсолнечника к заразихе

*М. А. Лебедева, М. С. Ганчева, М. Р. Лосев, А. А. Крутикова,
К. В. Племяшов, Л. А. Лутова*

451

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Влияние экспрессии гетерологичного гена *NDB2 Arabidopsis thaliana* на рост и дыхательную активность *Nicotiana tabacum*

*Н. Е. Кортаева, А. М. Шигарова, А. И. Катышев, И. В. Федосеева,
А. В. Федяева, Д. В. Савчин, А. М. Шишлова-Соколовская,
О. Ю. Урбанович, Г. Б. Боровский*

461

Интенсивность освещения влияет на состав жирных кислот суммарных липидов листьев и корней базилика (*Ocimum basilicum* L.)

Т. В. Иванова, А. С. Воронков

472

Кратковременная предобработка мелатонином повышает устойчивость растений ячменя к последующему действию кадмия

Е. Д. Данилова, И. Е. Злобин, М. В. Ефимова

484

Сравнительная оценка влияния наночастиц оксида меди и сульфата меди на структурно-функциональные характеристики *Thalassiosira weissflogii* в условиях накопительного культивирования

А. И. Акимов, Е. С. Соломонова, Н. Ю. Шоман, О. А. Рылькова

494

Влияние избытка цинка на активность компонентов антиоксидантной системы у растений *Brassica juncea* L. (Czern.) и *Sinapis alba* L.

И. А. Нилова, Н. С. Репкина, Н. М. Казнина

506

Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на рост проростков и лигнификацию корней *Pisum sativum* L. в норме и в условиях натрий-хлоридного засоления

*О. В. Ласточкина, С. Р. Гарипова, Л. И. Пусенкова,
Д. Ю. Гаршина, Ан. Х. Баймиев, И. С. Коряков*

514

Влияние NaCl на липидный профиль детергент-устойчивых мембран хлоропластов и митохондрий растений эугаллофитов

В. Н. Нестеров, Е. С. Богданова, О. А. Розенцвет

526

Связь дегидринов с адаптацией листовенницы Каяндера к условиям криолитозоны Якутии

Т. Д. Татарина, А. А. Перк, А. Г. Пономарев, И. В. Васильева

537

Салициловая кислота повышает холодоустойчивость регенерантов *Solanum tuberosum*, регулируя функционирование антиоксидантной системы

И. Ф. Головацкая, М. К. Кадырбаев, Е. В. Бойко, М. В. Филонова

547

УДК 581.1

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА К ЗАРАЗИХЕ

© 2023 г. М. А. Лебедева^{а, *}, М. С. Ганчева^а, М. Р. Лосев^а, А. А. Крутикова^б,
К. В. Племяшов^с, Л. А. Лугова^а

^а Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии,
Санкт-Петербург, Россия

^б Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных,
Санкт-Петербург, Россия

^с Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: m.a.lebedeva@spbu.ru

Поступила в редакцию 21.02.2023 г.

После доработки 27.02.2023 г.

Принята к публикации 28.02.2023 г.

Заразиха кумская, или подсолнечная (*Orobanche cumanana* Wallr.) является облигатным паразитическим растением, специфично поражающим подсолнечник и способным вызвать значительные потери его урожая. В связи с этим получение устойчивых к заразице сортов подсолнечника представляет важную для сельского хозяйства задачу. Селекция подсолнечника на устойчивость к заразице была начата еще в начале XX в. Важная заслуга в этом принадлежит советским селекционерам. Однако получение новых устойчивых сортов подсолнечника сопровождалось появлением новых вирулентных рас заразицы, которые преодолевали действие генов устойчивости. Для ряда генетических локусов подсолнечника, определяющих устойчивость к заразице, было определено местоположение на генетической карте, но лишь для некоторых из них были установлены вероятные гены-кандидаты и описан возможный молекулярный механизм их действия. Кроме того, в недавнее время были получены транскриптомные данные для устойчивых и чувствительных к заразице сортов подсолнечника, что также позволяет приблизиться к пониманию молекулярных основ формирования устойчивости. Рассмотрению молекулярно-генетических механизмов устойчивости подсолнечника к заразице, выявленных на основании данных по картированию локусов устойчивости и определению вероятных генов-кандидатов, а также данных транскриптомных исследований, и посвящен наш обзор.

Ключевые слова: заразица, подсолнечник, устойчивость, Or7, OrDeb2, R-гены

DOI: 10.31857/S0015330323600158, **EDN:** WWJIVN

ВВЕДЕНИЕ

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) – четвертая по значимости масличная культура в мире. Урожайность подсолнечника падает при заражении различными паразитами, наибольший урон среди которых наносит заразица подсолнечная (кумская) (*Orobanche cumanana* Wallr.). Заразица является облигатным паразитическим растением, не вырабатывающим хлорофилл, в связи с чем жизненно важным для нее становится контакт с растением-хозяином. Первое упоминание заражения заразицей подсолнечника относится к концу XIX в., когда в России начали активно выращивать подсолнечник, и заразица, ранее паразитирующая на полыни видов *Artemisia maritima incana* Schm и *A. austriaca* Jacq., переключилась на новый вид растения-хозяина. *O. cumanana* проявляет высокую специфичность в отношении подсолнечника, который является единственной сель-

скохозяйственной культурой, поражаемой заразицей этого вида. Это отличает *O. cumanana* от других паразитических растений из рода *Orobanche*, имеющих более широкий спектр растений-хозяев как среди сельскохозяйственных культур, так и среди представителей дикой природы [1]. Основным средством борьбы с заразицей является селекция подсолнечника на устойчивость к ней. Первый заразицоустойчивый сорт подсолнечника (Круглик 7-15-163) был выведен на Кубани в 1916 г. В.С. Пустовойтом методом многократного индивидуального отбора [2]. Впоследствии было получено еще несколько сортов, устойчивых к заразице и при этом характеризующихся высокими показателями хозяйственно ценных признаков [2]. Однако уже к концу 1920-х гг. эти сорта оказались неустойчивыми к новой расе заразицы, поразившей поля в Краснодарском крае, Ростовской и Воронежской областях. Таким образом, были диффе-

ренцированы две расы заразихи: раса А, к которой устойчивы первые выведенные заразихоустойчивые сорта подсолнечника, и раса В, к которой данные сорта оказались не устойчивыми [2, 3]. С этого началась гонка между селекционерами и заразихой. Каждый успех селекционеров в получении новых устойчивых сортов подсолнечника сопровождался появлением новых вирулентных рас заразихи, которые преодолевали действие генов устойчивости. На данный момент выделяют уже восемь рас заразихи, названных А, В, С, D, E, F, G и H, при этом доминирующей на большинстве полей Российской Федерации является раса G [4]. В связи с этим, генетическую устойчивость подсолнечника к заразихе можно рассматривать как “вертикальную”, возникающую к определенной расе (или определенному биотипу, выделяемому в пределах конкретной расы). По-видимому, такая устойчивость в каждом случае обусловлена возникновением доминантных мутаций в отдельных генах и определяется взаимодействием “ген-на-ген”: взаимодействием между геном устойчивости хозяина и геном авирулентности растения-паразита [1]. Это отличает взаимоотношения *O. cumana* с подсолнечником от взаимоотношений других представителей рода *Orobanchae* с их растениями-хозяевами, у которых устойчивость в большинстве случаев является “горизонтальной”, не обладающей расовой специфичностью [1, 5]. Гены подсолнечника, определяющие устойчивость к расам заразихи, принято обозначать как *Or* (от *Orobanchae* resistance). Так, *Vranceanu* с соавт. [6] было предложено использовать обозначения *Or1–Or5* для генов, определяющих устойчивость к известным на тот момент расам заразихи А–Е. В дальнейшем сходным образом были названы гены, обеспечивающие устойчивость к расам заразихи F и G (гены *Or6* и *7* соответственно). Однако следует отметить, что расы заразихи могут быть неоднородны и включать комплекс биотипов, отличающихся, в том числе, и по географическому распространению, и устойчивость к ним может определяться различными генами [3]. Лишь небольшое число генов подсолнечника, определяющих устойчивость к заразихе, было картировано, и предполагаемый молекулярный механизм действия был определен лишь для некоторых из них. Обсуждению этих механизмов и будет уделено основное внимание в настоящем обзоре.

Для начала рассмотрим жизненный цикл заразихи подсолнечной и основные этапы ее взаимоотношений с растением-хозяином.

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ЗАРАЗИХИ ПОДСОЛНЕЧНОЙ

Заразиха (*Orobanchae*) – род паразитических растений из семейства Заразиховые (*Orobanchaceae*).

Представители рода относятся к голопаразитам, т.е. они неспособны к фотосинтезу и в питании полностью зависят от растения-хозяина. Род Заразиха включает в себя более 200 видов, каждый из которых паразитирует на своем спектре хозяев. *O. cumana* является высокоспецифичным паразитом подсолнечника, способным уничтожить до 100% урожая. Поскольку подсолнечник – важная сельскохозяйственная культура, комплексное изучение паразитических отношений подсолнечника и заразихи представляется крайне важным.

Заразиха подсолнечная – высокопродуктивный вид: одно растение образует несколько тысяч крошечных семян почти микроскопического размера, которые распространяются на большие расстояния ветром или за счет прикрепления к другим объектам, в т.ч. к семенам подсолнечника [7]. Семя заразихи сохраняет жизнеспособность многие годы (до 20 лет) и прорастает только в присутствии потенциального хозяина, корни которого вырабатывают стимулятор прорастания семени заразихи [8]. Известно, что за прорастание семян паразитических растений ответственны фитогормоны стриголактоны, выделяемые корнями растения-хозяина. Основными стриголактонами, выделяемыми подсолнечником, являются оробанхила ацетат, 5-деоксистригол, а также сесквитерпеновые лактоны [9]. Кроме того, в корнях подсолнечника были выявлены 5-сорголактон и оробанхол [10]. Показано, что специфическим индуктором прорастания семян заразихи *O. cumana* является сесквитерпеновый лактон дегидрокостус-лактон, выделяемый корнями заразихи [8]. Кроме того, способность стимулировать прорастания семян заразихи описана для ряда других сесквитерпеновых лактонов [11], а также для неканонического стриголактона – гелиолактона [12].

После индукции прорастания зародышевым корнем растения формируется апрессорий – структура для прикрепления к корню подсолнечника. Клетки корня подсолнечника вырабатывают низкомолекулярные сигнальные вещества, индуцирующие формирование гаустории (*haustoria-inducing factors*, HIFs) [13]. Как было показано для ряда паразитических растений, в роли факторов, индуцирующих рост гаустории, выступает диметокси-р-бензохинон (ДМБХ), а также ряд других структурно родственных хинонов, которые, предположительно, могут возникать в результате разрушения лигнина клеточной стенки-растения хозяина [14]. Однако, в отношении *O. cumana* обработка ДМБХ не оказывала стимулирующего эффекта на рост и развитие гаустории, вызывая некроз корешка [15]. Гаустория – это структура, формируемая корнем заразихи для проникновения в осевую цилиндру корня подсолнечника [16]. Между проводящими системами паразита и хозяина устанавливается структурная связь, и заразиха использует питательные вещества, транспортируемые по прово-

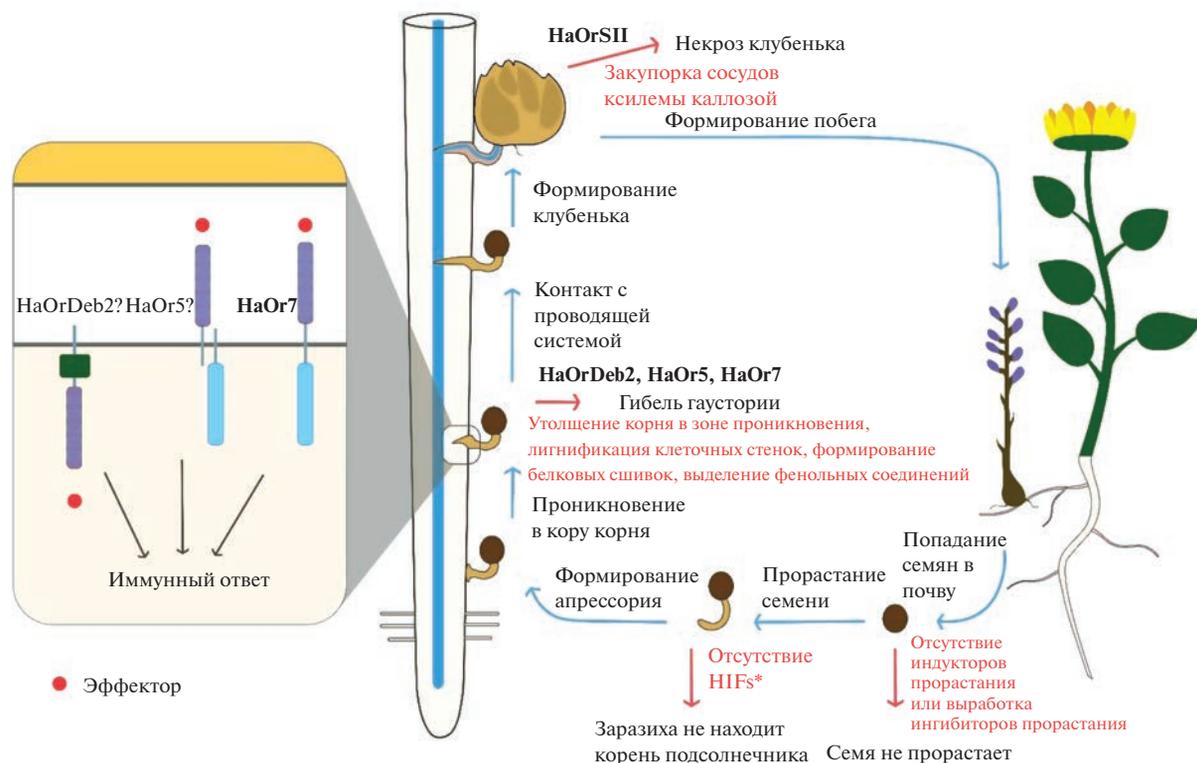


Рис. 1. Схема жизненного цикла заразицы подсолнечной и возможные механизмы формирования устойчивости. Описанные в литературе примеры устойчивости связаны с блоком развития гаустории в тканях корня подсолнечника и некротом гаустории, а также с блоком развития клубенька заразицы на этапе после установления контакта проводящих систем подсолнечника и заразицы. В частности, устойчивость на этапе проникновения гаустории в кору корня определяется геном *Or7*, кодирующим рецепторную киназу с доменом LRR, вероятно, задействованную в рецепции эффекторного белка, выделяемого заразицей и в запуске иммунного ответа. Устойчивость на этом же этапе также контролируется локусом *OrDeb2*, среди генов-кандидатов для которого описаны гены, кодирующие рецепторные белки с доменом LRR, но лишенные киназного домена, а также гены, кодирующие рецептор-подобные белки с киназными доменами, но лишенные экстраклеточного домена LRR. Такие белки могут работать в комплексах и узнавать эффекторные белки, выделяемые заразицей. Кроме того, среди вероятных кандидатов локуса *Or5*, описан ген, кодирующий белок NLR, относящийся к классу иммунных рецепторов, узнающих внутриклеточные эффекторные белки и активирующих иммунный ответ. Устойчивость на этапе после установления контакта проводящих систем подсолнечника и заразицы описана, в частности, для локуса *OrSII*, гены-кандидаты для которого еще не определены.

дующим тканям корня подсолнечника. С внешней стороны, в области прикрепления к корню подсолнечника, ткани проростка заразицы разрастаются с образованием так называемого “клубенька” (англ. tubercle), в котором происходит накопление питательных веществ. Впоследствии клубенька дает начало генеративным побегам, выходящими на поверхность почвы [16]. Цветки у заразицы подсолнечной мелкие и невзрачные, с изогнутым трубчатым венчиком. *O. citrana* относится к самоопылителям, однако способна и к перекрестному опылению [17]. В целом, в жизненном цикле заразицы можно выделить следующие стадии: 1) прорастание семени под индуцирующим влиянием веществ из корней подсолнечника; 2) формирование апрессория и прикрепление к корню растения-хозяина; 3) прорастание корешка заразицы (который на этом этапе многие исследователи называют гаусторией) сквозь клетки коры корня подсолнечника; 4) установление

структурной связи между проводящими системами (ксилемой и флоэмой) корня заразицы и подсолнечника (формирование собственно гаустории); 5) образование заразицей “клубеньков” в области прикрепления у поверхности корня подсолнечника; 6) формирование из клубеньков генеративных побегов с цветками; 6) самоопыление заразицы и формирование нового поколения семян (рис. 1).

Устойчивость растения-хозяина к заразице может формироваться на нескольких стадиях заражения — на этапе прорастания семени заразицы до прикрепления к корню подсолнечника; на этапе прорастания гаустории сквозь ткани корня растения-хозяина в направлении к его проводящему цилиндру; на этапе установления соединения гаустории с проводящей системой хозяина, а также на этапе развития клубенька заразицы. Возможным механизмом устойчивости может быть снижение выработки корнями подсолнечника

индукторов прорастания семян заразики, однако в природе такого рода устойчивые формы не были описаны [18]. Кроме того, на интенсивность прорастания семян заразики может влиять выработка ингибиторов прорастания, в частности, кумарина, относящегося к фитоалексинам [19]. Описан целый ряд примеров возникновения устойчивости к заразики, связанных с подавлением роста гаустории в коре корня подсолнечника и ее некрозом, а также с предотвращением формирования функционирующей гаустории [20]. Так, при развитии некоторых вариантов устойчивости в месте контакта с корнем заразики клетки суберинизируются и лигнифицируются, формируются поперечные белковые сшивки между клеточными стенками соседних клеток, выделяются фенольные соединения, токсичные для заразики [21]. Показана роль пероксидаз, образующихся в клетках зародышевого корня заразики, в лигнификации клеточных стенок коры корня подсолнечника [20]. Пероксидазы заразики взаимодействуют с фенольными соединениями, которые выделяются клетками корня подсолнечника, в результате чего запускается лигнификация их клеточных стенок. При этом расы заразики, не продуцирующие пероксидазы (например, раса D), могут быть способны проникать в ткани растения-хозяина и формировать гаустории [20]. Кроме того, в ряде случаев, когда заразики уже смогла проникнуть к осевому цилиндру растения-хозяина и сформировать функциональную гаусторию, может происходить закупоривание сосудов ксилемы корня подсолнечника каллозой в месте взаимодействия проводящих тканей паразита и хозяина, что приводит к отмиранию развивающихся клубеньков заразики. В частности, возникновение устойчивости на этом этапе связывают с повышением уровня экспрессии гена синтазы каллозы *HaGSL1* [22].

Для эффективной борьбы с заразихой подсолнечной необходимо понимание того, какие молекулярные механизмы могут определять такую устойчивость. Приблизиться к их расшифровке помогли работы по картированию и идентификации генов, определяющих устойчивость к заразики, исследования спектров экспрессирующихся генов, различающихся у устойчивых и чувствительных к заразики форм, а также работы по выявлению ассоциированных с устойчивостью к заразики QTL-локусов (quantitative trait locus, локусов количественных признаков).

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА К ЗАРАЗИХЕ МЕТОДОМ ПОЗИЦИОННОГО КЛОНИРОВАНИЯ

Для многих устойчивых к заразики форм подсолнечника, полученных в результате селекции, был изучен характер наследования признака устойчивости. В большинстве случаев устойчи-

вость к заразики наследуется как доминантный моногенный признак. В частности, было показано, что устойчивость к расам А–Е [6, 23, 24], F [25] и G [26] наследуется как моногенный доминантный признак. Однако, некоторые варианты устойчивости наследуются как доминантные признаки, контролируемые двумя генами [27]. Кроме того, в ряде случаев устойчивость к заразики наследовалась как рецессивный признак, контролируемый одним геном (устойчивость к расам Е–G [28]) или двумя генами (устойчивость к расе F [29]).

Для ряда локусов устойчивости к заразики были проведены эксперименты по картированию на хромосомах подсолнечника. Так, одним из первых был картирован локус *Or5*, определяющий устойчивость к расе E, который был локализован в теломерном участке третьей хромосомы [30]. Конкретный ген-кандидат для этого локуса так и не был выявлен. В работе Radwan с соавт. [31] было высказано предположение о том, что локус *Or5* может быть колокализован с геном, кодирующим белок NLR (nucleotide binding site (NBS) leucine-rich repeat (LRR)): один из генов, кодирующих NLR был идентифицирован как раз в области теломерного/около теломерного участка третьей хромосомы. Белки NLR известны как иммунные рецепторы, участвующие в распознавании эффекторных молекул фитопатогенов. Значительная часть R-генов растений, определяющих устойчивость растений к фитопатогенам в системе “ген-на-ген”, как было показано в последние годы, кодирует как раз белки NLR, узнающие специфические эффекторы фитопатогенов и запускающие иммунные реакции в организме растения-хозяина (ETI, effector triggered immunity) [32]. Впоследствии были картированы локусы, ассоциированные с устойчивостью к расам B, D и F (гены *Or2*, *Or4* и *Or6*), которые также были локализованы на третьей хромосоме [33]. Но конкретные гены, определяющие устойчивость к заразики, в этих исследованиях также не были идентифицированы. Ген *Or7* стал первым и к настоящему времени единственным геном, для которого было осуществлено точное картирование, позволившее выявить его молекулярную природу [34].

Обуславливающий устойчивость к расе F заразики ген *Or7* был локализован на седьмой хромосоме и успешно клонирован в работе Duriez с соавт. [34]. Ген *Or7* (*HanXRQChr07g0202981*), как оказалось, кодирует рецепторную киназу с лейцин-богатыми повторами. У сортов подсолнечника, чувствительных к заразики, был обнаружен преждевременный стоп-кодон в гене *Or7*, приводящий к отсутствию трансмембранного и киназного домена у кодируемого этим геном белка. У сортов подсолнечника, устойчивых к расе F заразики, такой преждевременный стоп-кодон в гене *Or7* отсутствует, таким образом, у них ген *Or7* кодирует полноразмерный рецепторный белок. Растения

подсолнечника с полноразмерным белком Or7 были устойчивы к заражению заразой: у них наблюдался блок на этапе установления соединения с проводящей системой паразита. Важно отметить, что рецептор Or7 обладает значительным сходством по последовательности с “иммунным” рецептором XA21 риса, наличие которого обуславливает устойчивость к бактериальному патогену *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Рецепторная киназа XA21 риса узнает эффекторный пептид, продуцируемый *X. oryzae*, приводящий к активации иммунного ответа у растения-хозяина и формированию устойчивости к фитопатогену [35]. Интересно, что продуцируемый *X. oryzae* пептид, названный RaxX (required for activation of XA21-mediated immunity X) схож по последовательности с пептидным гормоном PSY1 резуховидки *Arabidopsis thaliana*, относящимся к группе сульфатированных регуляторных пептидов [35]. Можно предположить, что белок Or7 также функционирует по схожему принципу и может участвовать в рецепции гипотетического сульфатированного пептида — фактора авирулентности, выделяемого заразой и запускающего иммунный ответ у подсолнечника (рис. 1). Такого рода реакции относят к так называемому эффектор-индуцируемому иммунитету (effector-triggered immunity), который лежит в основе принципа “ген-на-ген” при взаимодействии растений с фитопатогенами [36]. Однако, к настоящему времени механизм действия рецепторной киназы Or7 подсолнечника остается не изученным, и ее лиганд выявлен не был.

Для локуса *OrSII* (System II resistance), определяющего устойчивость к расам заразы F и G, также были проведены работы по картированию [37, 38]. Этот локус был получен от устойчивой инбредной линии подсолнечника PHSC1102, созданной компанией Pioneer Hi-Bred International (США) в 2008 г. [37]. Он был картирован на четвертой хромосоме подсолнечника. Локус *OrSII* определяет устойчивость к заразе на этапе формирования функциональной гаустории: у устойчивых растений происходит установление контакта с проводящей системой хозяина, формируются клубеньки, из которых развиваются побеги, останавливающиеся в дальнейшем развитии [38]. Гистологический анализ позволил выявить накопление фенольных соединений в клубеньках, формируемых заразой на корнях устойчивой линии, что, по мнению авторов, может обуславливать остановку роста растения-паразита на корнях устойчивых форм [38]. Однако, молекулярную природу гена *OrSII* и механизм его действия в формировании устойчивости к заразе еще предстоит выявить.

Or_{Deb2} — еще один локус устойчивости к заразе, который был картирован у подсолнечника. *Or_{Deb2}* локализован на четвертой хромосоме в области, охватывающей 1.38 млн п.н., и включающей

41 аннотированный ген [39]. Среди них выявлено девять генов, кодирующих киназы, а также шесть генов, кодирующих малые белки теплового шока. В пределах этого участка обнаружен кластер генов, кодирующих рецептор-подобные белки, содержащие домены LRR, но лишённые цитоплазматического киназного домена, а также рецептор-подобные белки, не содержащие экстраклеточного домена, но с одним или более киназным доменом. По мнению авторов, эти гены могут являться кандидатами на роль гена *Or_{Deb2}*. Ближайшими гомологами киназ, закодированных в области локуса *Or_{Deb2}*, у других растений являются рецептор-подобные белки из группы FERONIA и другие рецепторные киназы с малектин-подобным доменом [39]. Локус *Or_{Deb2}*, обуславливающий устойчивость к заразе, был получен при скрещивании с диким предком подсолнечника, *Helianthus debilis* subsp. *tardiflorus*, и введен в линию подсолнечника, названную DEB2, устойчивую к трем расам заразы — E, F и G [26, 39]. Устойчивость к *O. cumana*, определяемая локусом *Or_{Deb2}*, обусловлена нарушением проникновения заразы в ткани корня растения-хозяина, так, как и в случае Or7-опосредованной устойчивости. В большинстве случаев, как было показано с помощью гистологического анализа, рост корешка заразы останавливался в коре корня хозяина и не проникал в эндодерму [39]. По предположению авторов, такая остановка в формировании гаустории может быть связана с образованием изоляционного слоя из клеток коры вокруг тканей паразита, утолщением клеточных стенок клеток коры и накоплением в них суберина, или же с выделением клетками подсолнечника фенольных веществ, токсичных для заразы, поскольку подобные процессы были отмечены и для других случаев устойчивости к заразе, описанных в литературе [39].

ВЫЯВЛЕНИЕ QTL-ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ ПОДСОЛНЕЧНИКА К ЗАРАЗЕ, И СВЯЗАННЫХ С НИМИ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ

В работе Louagn с соавт. [40] была проведена масштабная работа по картированию в геноме подсолнечника QTL-локусов, определяющих устойчивость к заразе. Авторы использовали 101 рекомбинантную инбредную линию подсолнечника, полученную от потомков скрещивания между родительскими линиями HA89 и LR1 (сама линия LR1 изначально была получена от межвидового гибрида *H. annuus* и дикорастущего вида *H. debilis*) [40]. Данные инбредные линии были охарактеризованы по признакам устойчивости к расам F и G заразы. В качестве показателей устойчивости авторы оценивали несколько параметров, свидетельствующих об устойчивости на разных стадиях

развития паразитизма: долю “несовместимых прикреплений” (incompatible attachments), проявляющихся визуально в виде потемнений в области контакта корешка заразики и корня растения-хозяина в случае активации устойчивости на этапе развития гаустории; долю некротизированных клубеньков, образующихся при включении механизмов устойчивости уже после развития гаустории; установление контакта проводящих систем паразита и хозяина и формирование клубенька, а также число появившихся надземных побегов заразики в полевых экспериментах. Родительские формы различались по доле выявленных “несовместимых прикреплений”: их процент был выше у линии LR1 (46.51%) по сравнению с линией HA89 (3.51%), что свидетельствует о большей устойчивости к заразики линии LR1, при этом образования некротизированных клубеньков не были отмечено у обеих родительских линий [40]. Интересно, что для линии LR1 ранее было показано закупоривание сосудовсилемы подсолнечника каллозой в результате повышенной экспрессии гена синтазы каллозы *HaGSL1* в области контакта с гаусторией заразики [22]. Среди рекомбинантных инбредных линий подсолнечника были выявлены линии с высоким процентом “несовместимых прикреплений” (>50%), а также линии, образующие некротизированные клубеньки с частотой 50–60%, что свидетельствует о наличии у них механизмов устойчивости к заразики, проявляющихся на разных стадиях паразитизма. Всего в данном исследовании было выявлено 17 QTL-локусов, определяющих устойчивость к расам F и G заразики *O. cumana*, распределенных по девяти хромосомам подсолнечника. Среди возможных генов-кандидатов, колокализированных с QTL, авторы выделяют ген, кодирующий белок NBS-LRR (nucleotide-binding site leucine-rich repeat, NLR), ранее охарактеризованный в работе [31]. Этот ген оказался колокализирован с локусом QTL на хромосоме 15, который определяет повышенное число “несовместимых прикреплений” при заражении расой F. Кроме того, среди возможных генов-кандидатов авторы отмечают также три гена, кодирующих белки CC-NBS-LRR (coiled-coil NLR), колокализированные с локусами QTL, которые определяют устойчивость к заразики на разных стадиях развития: 1) способность к подавлению роста гаустории расы F в случае QTL на хромосоме 15, 2) способность к подавлению роста клубенька расы F в случае QTL на хромосоме 17, 3) снижение числа надземных побегов заразики в полевых экспериментах в случае QTL на хромосоме 13) [40]. Таким образом, гены, кодирующие NBS-LRR и CC-NBS-LRR, могут быть задействованы в формировании устойчивости к заразики как на стадии установления контакта гаустории с проводящей системой подсолнечника, так и на стадии развития клубенька. Участие белков NLR в установлении ра-

сосспецифичной устойчивости было показано ранее для взаимоотношений вигны и поражающего ее растения-паразита стриги *Striga gesnerioides* [41]. Устойчивость вигны сорта B301 к определенным расам стриги зависела от наличия функционального продукта гена *RSG3-301*, кодирующего белок NLR, – выключение этого гена приводило к потере устойчивости. При этом у устойчивого сорта вигны происходил блок на этапе установления соединения проводящих систем стриги и растения-хозяина, а также наблюдалась реакция сверхчувствительности в месте контакта и, как следствие, некроз тканей растения-паразита [41].

Секвенирование генома подсолнечника [42], накопление данных об однонуклеотидных полиморфных локусах (SNP, single nucleotide polymorphism) у различных линий и сортов в недавнем времени позволили провести полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, genome wide association study) для признака устойчивости к заразики. В исследовании Calderón-González с соавт. [43] в анализ были взяты 104 линии подсолнечника с различным уровнем устойчивости к трем популяциям *O. cumana*: к популяции расы F, собранной в Испании (так называемая раса F_{GV} (от Guadalquivir Valley, долина реки Гвадалквивир), расы E_{FR}, собранной во Франции, и расы G_{TK}, собранной в Турции. В этом исследовании наиболее значимые ассоциации с признаком устойчивости к заразики были обнаружены для SNP, расположенных в двух участках третьей хромосомы подсолнечника. Первый участок, длиной 5.2 млн п.н., включающий SNP, ассоциированные с устойчивостью к расам E и F заразики, содержал ряд генов, кодирующих белки-транспортёры и переносчики, в частности, транспортёр сахаров семейства SWEET, транскрипционные факторы из семейств C3H и AS2-LOB, а также ряд других белков. Второй участок, длиной 6.7 млн п.н., включал SNP, ассоциированные с устойчивостью к расе F. Важно отметить, что ранее с помощью методов позиционного картирования в теломерном участке третьей хромосомы был локализован ген *Or5* [30], но область локализации *Or5*, по данным Calderón-González с соавт. [43], лежала за пределами участков третьей хромосомы, которые были ассоциированы с признаком устойчивости к заразики. Кроме того, ранее Imerovski с соавт. [44] методом генетического картирования выявил в пределах третьей хромосомы также два локуса, *or3.1* и *or3.2*, определяющие устойчивость к заразики (оценивалась устойчивость к расе G из Сербии). Как отмечает Calderón-González с соавт. [43], эти локусы находятся как раз вблизи тех участков третьей хромосомы, которые показали наиболее значимые ассоциации с признаком устойчивости в их исследовании. Кроме того, Akhtouch с соавт. [45] также ранее картировали один из локусов устойчивости к расе F, наследуемой как рецессивный

признак, в третьей хромосоме. По данным Calderón-González с соавт. [43], этот локус находится рядом с участком размером в 6.7 млн п.н., выявленном в их исследовании [43]. Таким образом, с помощью различных подходов удалось обнаружить схожие участки в геноме подсолнечника, ответственные за формирование признака устойчивости к заразице. Кроме того, Calderón-González с соавт. [43] также выявили ряд ассоциаций признака устойчивости к заразице и с SNP на других хромосомах: 5, 10, 13, 15 и 16 [43]. Так, рядом с SNP на хромосоме 16, демонстрирующим значимую ассоциацию с признаком устойчивости к расе G, обнаружен ген, кодирующий этилен-зависимый транскрипционный фактор ERF114.

Более детальное изучение функций генов-кандидатов, расположенных в областях генома, выявленных с помощью GWAS в работе Calderón-González с соавт. [43], позволит лучше понять молекулярные основы взаимодействия подсолнечника с заразицей.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ПОДСОЛНЕЧНИКА К ЗАРАЗИЦЕ, С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА

При сравнении профиля экспрессии генов устойчивого и чувствительного к заразице сортов подсолнечника в работе Sisou с соавт. [46] были выявлены гены, дифференциально экспрессирующиеся при взаимодействии с заразицей. Авторы анализировали профили экспрессии генов до воздействия заразицы и на пятый день после “заражения” заразицей (нанесения на корни подсолнечника семян заразицы, предварительно стерилизованных и обработанных GR24 – синтетическим аналогом стриголактонов для индукции прорастания семян). В работе сравнивали чувствительный сорт (‘D.Y.3’) и устойчивый к заразице сорт подсолнечника (‘ЕМЕКЗ’), у которого происходил блок развития гаустории в клетках коры корня в связи с их лигнификацией. Среди дифференциально экспрессирующихся генов были выявлены гены, для которых ранее было показано участие в ответе на заражение патогенами. Это гены, кодирующие β -1,3-эндоглюканазу, β -глюканазу и этилен-зависимый транскрипционный фактор ERF4. В частности, у устойчивого к заразице сорта наблюдалась пониженная экспрессия гена *ERF4*. Для *A. thaliana* было показано, что мутация в гене *ERF4* обуславливала устойчивость к грибу *Fusarium oxysporum*, тогда как сверхэкспрессия этого гена вызывала подавление экспрессии генов, задействованных в ответе на стресс [47]. У устойчивого к заразице сорта подсолнечника также была увеличена экспрессия генов, кодирующих ферменты β -глюканазы, разрушающие β -глюканы – компоненты клеточной стенки растений. Предпола-

гается, что β -глюканазы растения-хозяина могут разрушать клеточные стенки заразицы, что приводит к высвобождению эффекторных молекул, запускающих иммунные реакции в корне подсолнечника, в частности, накопление лигнина и других фенольных соединений в месте проникновения паразита. В результате этого заразице не удается установить соединение с сосудистой системой хозяина, что приводит к некрозу тканей паразита [46].

Кроме того, в недавнем исследовании Huang с соавт. [48] был проведен транскриптомный анализ проростков подсолнечника линии HZ2399, устойчивой к расе F заразицы, по сравнению с контрольной линией, не обладающей устойчивостью. В этой работе были проанализированы самые ранние этапы взаимодействия подсолнечника с заразицей: от 4 до 72 ч после внесения семян заразицы к проросткам подсолнечника. В проростках устойчивой линии авторы выявили увеличение уровней экспрессии генов, ответственных за взаимодействие растений с фитопатогенами, биосинтез фенол-пропаноидных соединений, MAP-киназный сигналинг, гормональный сигналинг, биосинтез флавоноидов и пероксидазную активность. Среди генов с повышенной активностью в проростках устойчивой линии подсолнечника авторы выделили три гена, увеличение уровня экспрессии которых было подтверждено с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени: *4CL2* (ген 4-кумарат:CoA лигазы, участвующей в биосинтезе фенол-пропаноидных соединений), *EDS1* (Enhanced Disease Susceptibility 1, кодирующий белок, участвующий в иммунном сигнальном пути, опосредованном внутриклеточными иммунными рецепторами NLR (nucleotide-binding/leucine-rich-repeat)), а также ген *TGA3* (кодирующий транскрипционный фактор, опосредующий активацию экспрессии генов в ответ на действие салициловой кислоты). По мнению авторов, эти гены могут играть ключевую роль в формировании устойчивости подсолнечника к заразице [48]. Однако, для понимания механизмов устойчивости к заразице, необходимо также знание того, на каком именно этапе при заражении устойчивой линией HZ2399 наблюдается блок развития паразита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство описанных форм устойчивости подсолнечника к заразице относится к так называемой “вертикальной” устойчивости, формирующейся по отношению к определенным расам заразицы. Такая устойчивость развивается по механизму, известному как “ген-на-ген”, основанному на взаимодействии между продуктами гена устойчивости хозяина и гена авирулентности растения-паразита. Как было показано для различных примеров взаимодействия растений с фитопатогенами, в системе “ген-на-ген” в большинстве случаев ген

растения-хозяина, определяющий устойчивость, кодирует рецептор, способный распознавать специфический эффекторный белок, кодируемый геном авирулентности фитопатогена. Распознавание эффекторного белка фитопатогена рецептором растения-хозяина запускает так называемый специфический эффектор-опосредованный иммунитет (ЕТИ), включающий развитие реакции сверхчувствительности и формирование системной устойчивости к фитопатогену [36].

Только для одного локуса подсолнечника, *Or7*, был клонирован ген, ответственный за формирование устойчивости к заразице [34]. Им оказался ген, кодирующий рецепторную киназу с лейцин-богатыми повторами, имеющую высокое сходство с ранее охарактеризованным иммунным рецептором риса ХА21 [34, 35]. Для других локусов устойчивости были определены вероятные гены-кандидаты, колокализованные с ними. Так, в области локуса *Or_{Deb2}* были гены, кодирующие рецептор-подобные белки – лишённые экстраклеточного домена белки с одним или более киназным доменом, а также белки с доменами LRR, лишённые цитоплазматического киназного домена [39]. Такие рецептор-подобные белки могут работать в рецепторных комплексах и осуществлять рецепцию эффекторных белков, выделяемых растений паразитом. Кроме того, для ряда QTL-локусов подсолнечника была показана колокализация с генами, кодирующими белки NLR [40], представляющими собой ключевые иммунные рецепторы, узнающие эффекторные белки фитопатогенов и запускающие специфический иммунный ответ в организме растения-хозяина. Более того, было отмечено, что локус *Or5* также колокализован с геном, кодирующим белок NLR [31]. Эти данные подтверждают предположение о том, что гены, продукты которых задействованные в рецепции эффекторных белков заразицы и запуске специфического иммунитета, являются ключевыми регуляторами “вертикальной” устойчивости подсолнечника, формирующейся к определенным расам заразицы. У описанных форм подсолнечника, устойчивость которых, как предполагается, может определяться генами таких иммунных рецепторов, узнающих эффекторные белки заразицы, наблюдается развитие устойчивости на этапе роста гаустории в тканях корнях подсолнечника до ее прикрепления к проводящей системе растения-хозяина (рис. 1). Таким образом, именно на этом этапе, вероятно, происходит специфическое распознавание эффекторных молекул заразицы, способных индуцировать иммунитет в организме растения-хозяина.

Исследование транскриптомов и протеомов разных рас заразицы подсолнечной на этапе ее прорастания в корень растения-хозяина должно способствовать получению новых данных о молекулярной природе эффекторных белков заразицы

и способствовать более глубокому пониманию механизмов устойчивости подсолнечника к заразице, а также разработке новых способов борьбы с этим паразитическим растением.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с договором № 075-15-2022-322 от 22.04.2022 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета Российской Федерации. Грант был предоставлен на государственную поддержку создания и развития Научного центра мирового уровня “Агротехнологии будущего”.

Авторы благодарны Додуевой Ирине Евгеньевне за ценные замечания и обсуждение материала в ходе подготовки рукописи.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Velasco L., Pérez-Vich B., Fernández-Martínez J.M. Research on resistance to sunflower broomrape: an integrated vision // OCL. 2016. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016002>
2. Хатнянский В.И. История селекции подсолнечника в России на устойчивость к заразице // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2020. Т. 3. С. 147. <https://doi.org/10.25230/2412-608X-2020-3-183-147-156>
3. Антонова Т.С., Стрельников Е.А., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А. Разнообразие форм заразицы на подсолнечнике на юге России // Защита и карантин растений. 2014. Т. 11. С. 45.
4. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Саукова С.Л., Ивевор М.В. К вопросу о засоренности полей в регионах РФ семенами заразицы (*Orobanche cumana* Wallr.) – облигатного паразита подсолнечника // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2022. Т. 4. С. 29. <https://doi.org/10.31857/2500-2082/2022/4/29-32>
5. Pérez-Vich B., Velasco L., Rich P.J., Ejeta G. Marker-assisted and physiology-based breeding for resistance to root parasitic Orobancheaceae // Parasitic Orobancheaceae / Eds. Joel D., Gressel J., Musselman L. Berlin, Heidelberg: Springer. 2013. P. 369. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38146-1_21
6. Vranceanu A.V., Tudor V.A., Stoenescu F.M., Pirvu N. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr. [root parasite], differential hosts and resistance sources and genes in sunflower // Proc. 9th Int. Sunflower Conf., Torremolinos, Malaga (Spain), 8–13 June 1980. Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicaciones Agrarias, 1981.
7. Fernández-Martínez J.M., Pérez-Vich B., Velasco L. Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) // Sunflower / Eds. Martínez-Force E., Dunford N.T.,

- Salas J.J. AOCs Press, 2015. P. 129.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50011-8>
8. Joel D.M., Chaudhuri S.K., Plakhine D., Ziadna H., Steffens J.C. Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana* // *Phytochemistry*. 2011. V. 72. P. 624.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.037>
 9. Yoneyama K., Xie XiaoNan, Kisugi T., Nomura T., Sekimoto H., Yokota T., Yoneyama K. Characterization of strigolactones exuded by Asteraceae plants // *Plant Growth Regul.* 2011. V. 65. P. 495.
<https://doi.org/10.1007/s10725-011-9620-z>
 10. Bharti N., Tripathi S., Bhatla S.C. Photomodulation of strigolactone biosynthesis and accumulation during sunflower seedling growth // *Plant Signal Behav.* 2015. V. 10: e1049792.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1049792>
 11. Raupp F.M., Spring O. New Sesquiterpene Lactones from Sunflower Root Exudate as Germination Stimulants for *Orobanche cumana* // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 10481.
<https://doi.org/10.1021/jf402392e>
 12. Ueno K. Furumoto T., Umeda S., Mizutani M., Takikawa H., Batchvarova R., Sugimoto Y. Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower // *Phytochemistry*. 2014. V. 108. P. 122.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.018>
 13. Thorogood C.J., Hiscock S.J. Compatibility interactions at the cellular level provide the basis for host specificity in the parasitic plant *Orobanche* // *New Phytol.* 2010. V. 186. P. 571.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03173.x>
 14. Goyet V., Wada S., Cui S., Wakatake T., Shirasu K., Montiel G., Simier P., Yoshida S. Haustorium Inducing Factors for Parasitic Orobancheaceae // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1056.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01056>
 15. Fernández-Aparicio M., Masi M., Cimmino A., Evidente A. Effects of Benzoquinones on Radicles of *Orobanche* and *Phelipanche* Species // *Plants*. 2021. V. 10. P. 746.
<https://doi.org/10.3390/plants10040746>
 16. Rispail N., Dita M.A., González-Verdejo C., Pérez-de-Luque A., Castillejo M.A., Prats E., Román B., Jorrín J., Rubiales D. Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe // *New Phytol.* 2007. V. 173. P. 703.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01980.x>
 17. Rodríguez-Ojeda M.I., Fernández-Martínez J.M., Velasco L., Pérez-Vich B. Extent of cross-fertilization in *Orobanche cumana* Wallr. // *Biol Plant.* 2013. V. 57. P. 559.
<https://doi.org/10.1007/s10535-012-0301-1>
 18. Höniges A., Wegmann K., Ardelean A. *Orobanche* resistance in sunflower // *Helia*. 2008. V. 31. P. 1.
<https://doi.org/10.2298/HEL0849001H>
 19. Serghini K., Pérez de Luque A., Castejón-Muñoz M., García-Torres L., Jorrín J.V. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins // *J. Exp. Bot.* 2001. V. 52. P. 2227.
<https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2227>
 20. Antonova T.S., Terborg S.J. The role of peroxidase in the resistance of sunflower against *Orobanche cumana* in Russia // *Weed Research*. 1996. V. 36. P. 113.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1996.tb01807.x>
 21. Echevarría-Zomeño S., Pérez-de-Luque A., Jorrín J., Maldonado A.M. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 4189.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erl195>
 22. Letousey P., de Zélicourt A., Vieira Dos Santos C., Thoiron S., Monteau F., Simier P., Thalouarn P., Delavault P. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower // *Plant Pathol.* 2007. V. 56. P. 536.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01575.x>
 23. Бурлов В.В., Костюк С.В. Бурлов В.В., Костюк С.В. Наследование устойчивости к местной расе заразики (*Orobanche cumana* Wallr.) у подсолнечника // *Генетика*. 1976. Т. 12. С. 44.
<https://doi.org/10.25230/2412-608X-2022-3-191-9-13>
 24. Погорлецкий Б.К., Гешеле Э.Э. Об иммунитете подсолнечника к заразику // *Генетика*. 1975. Т. 11. С. 18.
 25. Pacureanu-Joita M., Veronesi C., Raranciuc S., Stanciu D. Parasite-host plant interaction of *Orobanche cumana* Wallr. (*Orobanche cernua* Loefl) with *Helianthus annuus* // *Proc. 16th Int. Sunflower Conf., Fargo, ND, USA, Aug. 29–Sept. 2. 2004.* P. 171.
 26. Velasco L., Pérez-Vich B., Yassein A., Jan C., Fernández-Martínez J.M. Inheritance of resistance to sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in an interspecific cross between *Helianthus annuus* and *Helianthus debilis* subsp. *tardiflorus* // *Plant Breeding*. 2012. V. 131. P. 220.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01915.x>
 27. Pacureanu-Joita M., Raranciuc S., Stanciu D., Sava E., Nastase D. Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations in Romania // *HELIA*. 2009. V. 32. P. 111.
<https://doi.org/10.2298/hel0951111p>
 28. Imerovski I., Dimitrijević A., Miladinović D., Dedić B., Jocić S., Kočiš Tubić N., Cvejić S. Mapping of a new gene for resistance to broomrape races higher than F // *Euphytica*. 2016. V. 209. P. 281.
<https://doi.org/10.1007/s10681-015-1597-7>
 29. Akhtouch B., Muñoz-Ruz J., Melero-Vara J.M., Fernández-Martínez J.M., Domínguez J. Inheritance of resistance to race F of broomrape in sunflower lines of different origins // *Plant Breeding*. 2002. V. 121 (3). P. 266.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.00701.x>
 30. Tang S., Heesacker A., Kishore V.K., Knapp S.J. Genetic Mapping of the Or5 gene for resistance to *Orobanche* race E in sunflower // *Crop Sci.* 2003. V. 43. P. 1021.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1021>
 31. Radwan O., Gandhi S., Heesacker A., Whitaker B., Taylor C., Plocik A., Kesseli R., Kozik A., Michelmore R.W., Knapp S.J. Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance

- proteins in sunflower // *Mol. Genet. Genomics*. 2008. V. 280. P. 111.
<https://doi.org/10.1007/s00438-008-0346-1>
32. *van Wersch S., Tian L., Hoy R., Li X.* Plant NLRs: The Whistleblowers of Plant Immunity // *Plant Communications*. 2020. V. 1. P. 100016.
<https://doi.org/10.1016/j.xplc.2019.100016>
33. *Imerovski I., Imerovski I., Dimitrijević A., Miladinović D., Dedić B., Jocić S., Kovačević B., Obreht D.* Identification of PCR markers linked to different Or genes in sunflower // *Plant Breeding*. 2013. V. 132. P. 115.
<https://doi.org/10.1111/pbr.12022>
34. *Duriez P., Vautrin S., Auriac M.C., Bazerque J., Boniface M.C., Callot C., Carrère S., Cauet S., Chabaud M., Gentou F., Lopez-Sendon M., Paris C., Pegot-Espagnet P., Rousseaux J.C., et al.* A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana* // *Nat Plants*. 2019. V. 5. P. 1211.
<https://doi.org/10.1038/s41477-019-0556-z>
35. *Pruitt R.N., Joe A., Zhang W., Feng W., Stewart V., Schwessinger B., Dinneny J. R., Ronald P. C.* A microbially derived tyrosine-sulfated peptide mimics a plant peptide hormone // *New Phytol.* 2017. V. 215. P. 725.
<https://doi.org/10.1111/nph.14609>
36. *Shafikova T.N., Omelichkina Y.V.* Molecular–genetic aspects of plant immunity to phytopathogenic bacteria and fungi // *Rus. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 571–585.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715050143>
37. *Hassan E.S.A.R.S., Hoefft E., Li Z., Tulsieram L.* Genetic markers for *Orobanche* resistance in sunflower (US Patent Publication US/2008/0178325 A1). 2008.
38. *Martín-Sanz A., Pérez-Vich B., Rueda S., Fernández-Martínez J.M., Velasco L.* Characterization of post-haustorial resistance to sunflower broomrape // *Crop Sci.* 2020. V. 60. P. 1188.
<https://doi.org/10.1002/csc2.20002>
39. *Fernández-Aparicio M., Del Moral L., Muñoz S., Velasco L., Pérez-Vich B.* Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived OrDeb2 gene against highly virulent races of *Orobanche cumana* Wallr // *Theor. Appl. Genet.* 2022. V. 135. P. 501.
<https://doi.org/10.1007/s00122-021-03979-9>
40. *Louarn J., Boniface M.C., Pouilly N., Velasco L., Pérez-Vich B., Vincourt P., Muñoz S.* Sunflower resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) is controlled by specific QTLs for different parasitism stages // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 590.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00590>
41. *Li J., Timko M.P.* Gene-for-gene resistance in Striga-cowpea associations // *Science*. 2009. V. 325. P. 1094.
<https://doi.org/10.1126/science.117475>
42. *Badouin H., Gouzy J., Grassa C.J., Murat F., Staton S.E., Cottret L., Lelandais-Brière C., Owens G.L., Carrère S., Mayjonade B., Legrand L., Gill N., Kane N.C., Bowers J.E., et al.* The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution // *Nature*. 2017. V. 546. P. 148.
<https://doi.org/10.1038/nature22380>
43. *Calderón-González Á., Pérez-Vich B., Pouilly N., Boniface M.C., Louarn J., Velasco L., Muñoz S.* Association mapping for broomrape resistance in sunflower // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 13. P. 1056231.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1056231>
44. *Imerovski I., Dedić B., Cvejić S., Miladinović D., Jocić S., Owens G.L., Kočič Tubić N., Rieseberg L.H.* BSA-seq mapping reveals major QTL for broomrape resistance in four sunflower lines // *Mol. Breeding*. 2019. V. 39. P. 41.
<https://doi.org/10.1007/s11032-019-0948-9>
45. *Akhtouch B., Akhtouch B., del Moral L., Leon A., Velasco L., Fernández-Martínez J.M., Pérez-Vich B.* Genetic study of recessive broomrape resistance in sunflower // *Euphytica*. 2016. V. 209. P. 419.
<https://doi.org/10.1007/s10681-016-1652-z>
46. *Sisou D., Tadmor Y., Plakhine D., Ziadna H., Hübner S., Eizenberg H.* Biological and transcriptomic characterization of pre-haustorial resistance to sunflower broomrape (*Orobanche cumana* W.) in sunflowers (*Helianthus annuus*) // *Plants*. 2021. V. 10. P. 1810.
<https://doi.org/10.3390/plants10091810>
47. *McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Schenk P.M., Edgar C.I., Maclean D.J., Scheible W.R., Udvardi M.K., Kazan K.* Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression // *Plant Physiol.* 2005. V. 139. P. 949.
<https://doi.org/10.1104/pp.105.068544>
48. *Huang Q., Lei Z., Xiang L., Zhang W., Zhang L., Gao Y.* Transcriptomic analysis of sunflower (*Helianthus annuus*) roots resistance to *Orobanche cumana* at the seedling stage // *Horticulturae*. 2022. V. 8. P. 701.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8080701>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА
NDB2 Arabidopsis thaliana НА РОСТ
И ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ *Nicotiana tabacum*¹

© 2023 г. Н. Е. Коротаева^{a, *}, А. М. Шигарова^a, А. И. Катъшев^a, И. В. Федосеева^a,
А. В. Федяева^{a, b}, Д. В. Савчин^c, А. М. Шишлова-Соколовская^c,
О. Ю. Урбанович^c, Г. Б. Боровский^a

^a Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

^b Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

^c Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

*e-mail: knev73@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.01.2023 г.

После доработки 14.03.2023 г.

Принята к публикации 16.03.2023 г.

С помощью агробактериальной трансформации и последующего отбора получены линии табака (*Nicotiana tabacum* L.) с высокой экспрессией гена *AtNDB2* (*NDB2* из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Типичная по внешнему виду и величине экспрессии *AtNDB2* линия 13s была исследована по ростовым показателям и параметрам дыхательной активности при оптимальной и субоптимальной температурах в сравнении с исходной разновидностью *N. tabacum*. Результаты показали, что в условиях субоптимальной температуры в растениях линии 13s наблюдалось усиление общего и альтернативного дыхания и снижение генерации супероксидного аниона. Скорость роста у растений с усиленной экспрессией *AtNDB2* по сравнению с контрольными была снижена, особенно при температуре ниже температурного оптимума. Обсуждаются возможные причины таких изменений.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *AtNDB2*, АФК, агробактериальная трансформация, активность дыхания, скорость роста

DOI: 10.31857/S0015330323600031, EDN: PBSFBL

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что повышению защитных свойств растений по отношению к неблагоприятным факторам внешней среды способствует умеренное увеличение концентрации эндогенных АФК в растительной ткани, которые являются сигнальными молекулами для запуска ряда защитных механизмов. В нестрессовых условиях АФК образуются в клетке на низких уровнях в результате утечки электронов во время фотосинтеза, дыхания и фотодыхания [1]. В ответ на эндогенные сигналы (гормоны и сигнальные молекулы), а также стимулы окружающей среды (биотические или абиотические стрессы) индуцируется несколько ферментов, продуцирующих АФК, таких как: NAD(P)H-окси-

дазы, аминоксидазы, полиаминоксидазы, оксалазоксидазы и большое семейство пероксидаз класса III [2, 3]. Считается, что в клетках растений среди ферментов, продуцирующих АФК, основное участие принимают NAD(P)H-оксидазы [4, 5]. В растительных клетках большая часть вырабатываемых АФК происходит из хлоропластов или пероксисом, но в незеленых тканях или в темноте продукция АФК в митохондриях становится преобладающей [6, 7]. Митохондрии являются одной из главных мишеней окислительного повреждения при стрессе [8], с другой стороны, они остаются одним из наиболее важных источников АФК [9, 10]. В изолированных митохондриях клеток растений и животных основными сайтами генерации АФК являются комплексы I и III дыхательной цепи [11].

При энергозапасующем окислении NADH митохондриями функционирует комплекс I дыхательной цепи, который является одной из точек генерации мембранного потенциала. У большин-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600031 для авторизованных пользователей.

Сокращения: АОХ — альтернативная оксидаза; БГК — бензгидроксамовая кислота; НФП — нефосфорилирующий путь.

ства организмов его работа ингибируется ротеноном. Часть организмов, в том числе растения, грибы и некоторые микроорганизмы, имеют дыхание, не чувствительное к ротенону. NADH или NADPH при этом окисляется несколькими ферментами, локализованными на наружной или на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны. У *Arabidopsis thaliana* найдены три группы генов, кодирующих такие NAD(P)H-дегидрогеназы второго типа (NDII): *NDA* (два гена), *NDB* (четыре гена), и *NDC* (один ген) [12]. Установлена локализация данных ферментов: NDB1–NDB4 являются внешними (расположены на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий), а NDA1–NDA2 и NDC1 – внутренними (обращены к митохондриальному матриксу) [13]. Точные физиологические функции конкретных белков семейства NDII не определены. Наиболее распространенной точкой зрения является их вовлеченность (вместе с альтернативной оксидазой – АОХ) в формирование нефосфорилирующей дыхательной цепи (или нефосфорилирующего пути, НФП) при окислительном стрессе и метаболическом дисбалансе [14]. С этими представлениями согласуются и наши данные о том, что в прорастающих семенах сохраняется способность митохондрий к окислению экзогенного NADH при действии отрицательной температуры, и именно окисление внешнего NADH, главным образом, обеспечивает энергетический метаболизм при низких температурах у растений [15]. Однако в вопросе о связи активности NDII и уровня генерации АФК много неясного. Поскольку альтернативные NAD(P)H дегидрогеназы растений содержат в качестве кофактора ФАД, исследователи не исключают, что они могут быть потенциальными сайтами генерации АФК у растений [9].

Перекликающиеся с этим данные были получены нами: митохондриальный мембранный потенциал и уровень генерации АФК существенно подавлялись добавлением к клеткам *Saccharomyces cerevisiae* DPI (дифенилениодониум, ингибитор внешних и внутренних NADH-дегидрогеназ), а также у дрожжей с делецией гена *NDE1*, кодирующего наружную NAD(P)H-дегидрогеназу. Следовательно, NAD(P)H-дегидрогеназы – это важный источник АФК [16]. С помощью изолированных митохондрий *S. cerevisiae* показано, что внешние NADH-дегидрогеназы являются основными источниками генерации АФК при использовании NADH в качестве субстрата [17]. Аналогичная ситуация наблюдалась в клетках гриба *Neurospora crassa*. Делеция генов *NDE1* и *NDE2*, кодирующих внешние альтернативные NADH-дегидрогеназы, снижала продукцию АФК при обработке прооксидантом паракватом [18]. Таким образом, несмотря на то, что существует много аргументов за то, что ферменты NDII участвуют в снижении ге-

нерации АФК, активность этих дегидрогеназ служит в ряде случаев источником АФК.

У растений полностью блокировать синтез всех NDII не удастся, поскольку при этом невозможно получить жизнеспособные семена [19], однако опубликовано несколько работ по растениям *A. thaliana* со сниженной экспрессией отдельных генов NDII. Исследователи [20, 21] изучали, как подавление экспрессии генов *NDA1*, *NDA2*, а также *NDB1*, кодирующих альтернативные внутренние и внешние NAD(P)H дегидрогеназы *A. thaliana*, влияет на рост и метаболизм растений, а также на изменение экспрессии других генов. Показано, что снижение количества белков *NDA1* и *NDA2* приводит к замедлению роста и повышению уровня лактата. Увеличение интенсивности света активировало экспрессию гена альтернативной оксидазы (*AOX1a*), повышало активность АОХ и цитохром с оксидазы, а также уровень метаболитов цикла Кребса. Однако существенных фенотипических различий между мутантами и родительским типом не было выявлено [20]. Снижение количества белка *NDB1* нарушало рост растений, но не влияло на дыхательную активность. В то же время, недостаток *NDB1* значительно влиял на экспрессию генов, участвующих в белковом синтезе, а также в функционировании сигнальных систем растений [21]. К сожалению, уровень генерации АФК в этих экспериментах не определяли.

Существуют результаты, показывающие, что частичное подавление экспрессии гена *NDB4*, кодирующего внешнюю NADH-дегидрогеназу *A. thaliana*, приводило к снижению уровня генерации АФК. Авторы полагают, что данный эффект обуславливается повышением активности антиоксидантных ферментов и альтернативной оксидазы [19]. Долгое время неисследованным с использованием нокаут мутантов оставался белок *NDB2*. Между тем этот белок, возможно, имеет наибольшее отношение к устойчивости растений к стрессам. На такую возможность кроме физиологических исследований, о которых было написано выше, указывают эксперименты с растениями *A. thaliana*, у которых с помощью RNAi был уменьшен синтез *NDB4*. Такие растения, вероятно, вследствие компенсаторного эффекта, значительно увеличили синтез *NDB2* и АОХ, что привело к уменьшению образования АФК клетками, увеличению солеустойчивости, а также некоторым изменениям в скорости роста и фенотипе растений [19]. С использованием озимой пшеницы также было показано, что повышение способности АОХ к транспорту электронов после действия на проростки закалывающей отрицательной температуры связано с сохранением высокой активности *NDB2*, которая, вероятно, играет важную роль в поддержании функционального состояния митохондрий в гетеротрофных тканях растений при действии отрицательных температур [22]. Наконец,

в 2019 г. появилась работа Sweetman с соавт. [14], в которой был показан рост устойчивости *A. thaliana* к засухе при одновременной гиперэкспрессии *AtAOX1a* и *AtNDB2*, в то же время гиперэкспрессор одного гена *NDB2* не демонстрировал фенотипических отличий от дикого типа и повышенной устойчивости к засухе.

Субоптимальные температуры для теплолюбивых растений являются более физиологичными, поскольку их воздействию растения в естественных условиях подвержены значительно более длительное время вегетации, чем действию более низких температур [23]. Субоптимальные температуры, в отличие от холодового стресса, замедляют, но не останавливают рост и метаболизм растений [23, 24]. При этом защитные механизмы, подготавливающие растения к воздействию более низких температур, активируются при субоптимальном температурном воздействии, в том числе у табака [25]. По нашим представлениям, повышенная активность *NDB2* должна изменять в растениях потенциал на внутренней митохондриальной мембране и уровень генерации АФК как при стрессе, так и в нормальных условиях. Изменение уровня АФК, в свою очередь может влиять на реакцию растений на температуру внешней среды. Таким образом, целью нашей работы было определение роли альтернативных путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий растений при неблагоприятных условиях. Задачей исследования являлась характеристика растений табака с гиперэкспрессией гетерологичного гена *NDB2 A. thaliana* в нормальных условиях выращивания и в условиях воздействия субоптимальной температуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника для клонирования нативного гена *AtNDB2* использованы растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Columbia). В экспериментах по трансформации использована линия табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1. Выделение РНК и синтез кДНК выполняли с помощью наборов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit и RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). Для последующего клонирования амплифицировали с помощью ПЦР с использованием Pfu-полимеразы и синтетических олигонуклеотидов NDB2-F и NDB2-R (табл. 1 Дополнительные материалы) последовательность кДНК гена *NDB2 A. thaliana*, соответствующую транслируемой области мРНК.

При создании векторных конструкций использовали методики ПЦР, рестрикции и лигирования фрагментов ДНК, основанные на стандартных протоколах [26]. Векторная конструкция для трансформации растений получена на основе бинарного вектора pBI121 [27]. Предварительно в

данный вектор были введены дополнительные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I, что позволяло клонировать целевой ген между конститутивным промотором 35S РНК CaMV и терминатором нопаин-синтазы (*NOS*). Корректность сборки векторных конструкций подтверждали методом NGS-секвенирования на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США), используя набор Nextera XT DNA (Illumina, США). Анализ данных NGS выполняли с помощью программ FastQC, Trimmomatic, SPAdes, UGENE, Vector NTI. Для введения гетерологичного гена *AtNDB2* применяли *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию листовых дисков 3–4-недельных растений табака, выращенных при температуре 24°C, освещенности 140 мкмоль/(м² с), 16/8 ч (свет/темнота) фотопериоде.

Для инициации процессов морфогенеза и отбора первичных трансформантов использовали питательные среды CIM, SIM и RIM [28] с селективным агентом канамицином в концентрации 50 мг/л. Выделение растительной ДНК выполняли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). Тотальную РНК выделяли с помощью набора реагентов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) по методике изготовителя. Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью набора реагентов First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) по методике изготовителя. Анализ регенерантов производили методами ПЦР и ПЦР-РВ, используя синтетические олигонуклеотиды, представленные в таблице 1 Дополнительных материалов. ПЦР-РВ проводили на приборе CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США), используя набор реактивов qPCR mix-HS SYBR (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Анализ данных ПЦР-РВ проводили с помощью программного обеспечения SFX Manager (Bio-Rad, Германия). В качестве референсных генов в количественной ПЦР использовали гены *EF-1α* и *NTUBc2* [29]. В результате размножения и отбора на селективной среде получено продуктивное поколение регенерантов табака T4, не проявляющее расщепления в следующем поколении, выживающее на селективной среде с канамицином и демонстрирующее стабильную экспрессию гена *NDB2 A. thaliana*. Поколение T5 выращивали в ростовых климатических камерах (Binder, Германия) при освещении 140 мкмоль/(м² с), фотопериоде 16/8 (день/ночь) и температуре 25/20°C, соответственно, с ежемесячным внесением комплексного минерального удобрения “Акварин для цветов” (ОАО “Буйский химический завод”) в концентрации 1 г/л до момента сбора семян. Типичная по своим свойствам линия 13s, несущая ген *NDB2 A. thaliana*, была выбрана в качестве экспериментальной для дальнейшего исследова-

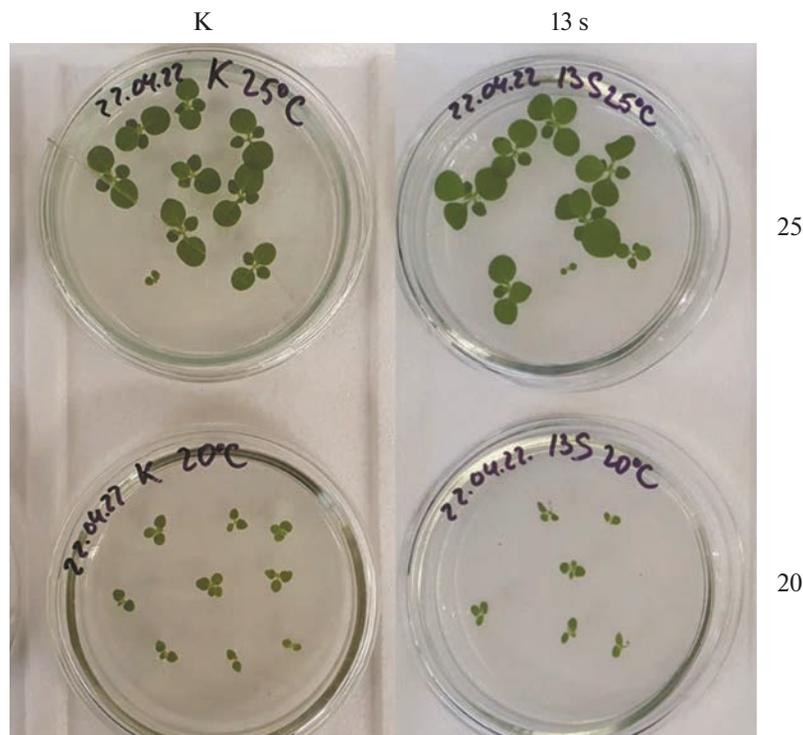


Рис. 1. Трансформированные растения табака и растения дикого типа через 21 сутки после начала роста на агаризованной питательной среде. 13s – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; K – дикий тип; 20 – выращивание при 20°C; 25 – выращивание при 25°C. Диаметр чашки Петри равен 10 см.

ния. В качестве контроля использовали нетрансформированные растения табака.

Семена табака, полученные от растений дикого типа и растений линии 13s, стерилизовали в ламинарном боксе в 0.05% растворе Tween 20 (2 мин), 0.04% растворе гипохлорита натрия (4 мин) и 96% этаноле (5 с), периодически встряхивая и промывая после каждого стерилизующего раствора 5-6 раз в дистиллированной воде. После стерилизации семена раскладывали в чашки Петри на агаризованную питательную среду, содержащую $\frac{1}{2}$ солей по Murashige и Skoog [30] с добавлением 360 мг/л сахарозы, 0.6 мг/л тиамина, 0.3 мг/л пиридоксина, 0.3 мг/л никотиновой кислоты, 0.6 мг/л инозита. После этого чашки Петри помещали в ростовые камеры MKT-240 (Binder, Германия) при освещении 140 мкмоль/(м² с), фотопериоде 16/8 (день/ночь) и температуре 20°C или 25°C. Начиная с 8 сут растения фотографировали и производили подсчет суммарной площади листовых пластинок в программе ImageJ, для этого использовали фотографии растений на 8, 10, 14, 18 и 20 сут.

Оценку накопления белкового продукта гена гиперэкспрессора *NDB2* проводили с помощью электрофореза и Western blot в системе Bio-Rad. Для выделения общего белка использовали 0.5 г листьев 2-месячных растений. Листья замораживали в жидком азоте и растирали с кварцевым песком в 2.5 мл буфера, содержащего 100 мМ

Трис-НСI (рН 7.4), 0.1% ДДС, 12 мМ β-меркаптоэтанол, 0.5 мМ фенолметилсульфонилфлюорид и 50 мг нерастворимого поливинилпирролидона. После центрифугирования (18000 g, 10 мин) белок из супернатанта осаждали пятикратным объемом охлажденного до –20°C ацетона (8500 g, 10 мин). Полученный осадок растворяли в буфере для образца и определяли содержание белка в получившихся пробах с реактивом Брэдфорд (Bio-Rad, США). По 30 мкг белка из каждой пробы разделяли электрофоретически в 12% ПААГ в присутствии ДДС и переносили на нитроцеллюлозную мембрану в системе miniProtean III (Bio-Rad, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Для идентификации белка *NDB2* использовали первичные антитела против *NDB2* (PHY1403A, PhytoAB, США) и вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Визуализацию антител проводили с использованием хромогенов BCIP (5-bromo-6-chloro-3-indolylphosphate-p-toluidine salt, Gerbu, Германия) и NBT (nitrotetrazolium blue chloride, AppliChem, Германия).

Оценку дыхательной активности и показателей окислительного стресса проводили на 21-дневных растениях, выращенных при 25°C, и 28-дневных растениях, выращенных при 20°C (рис. 1). Растения разного возраста использовали, чтобы уменьшить у опытных образцов разницу в размере сум-

марной площади листовых пластинок. Чтобы охарактеризовать дыхание, проводили измерение скорости поглощения кислорода измельченными листьями при 20°C или 25°C, соответственно температуре выращивания растений. Скорость поглощения кислорода определяли полярографически с использованием электрода Кларка и системы Oxytherm (Hansatech Instruments, Англия). Для измерения общей скорости поглощения кислорода клетками 50 мг листьев инфильтровали буфером Tris-HCl (100 мМ, pH 7.5), далее листья измельчали лезвием на отрезки не более 1 мм шириной и помещали в ячейку объемом 1.4 мл, содержащую насыщенный кислородом буфер Tris-HCl (100 мМ, pH 7.5). Сначала измеряли скорость поглощения кислорода без ингибиторов. Для оценки скорости цианид-устойчивого дыхания, связанного с активностью альтернативной оксидазы, в ячейку последовательно добавляли KCN (ингибитор цитохром с-оксидазы митохондрий) до конечной концентрации 1.2 мМ и бензгидроксамовую кислоту (БГК, ингибитор альтернативной оксидазы митохондрий) до конечной концентрации 6 мМ. Оптимальную концентрацию ингибиторов подбирали титрованием с возрастающей концентрацией до такой, после которой дальнейшее увеличение концентрации уже не влияет на скорость поглощения O₂. Дыхание после добавления этих ингибиторов считали остаточным (немитохондриальным). Концентрацию ингибиторов и длительность инкубации подбирали в предварительном эксперименте. Скорость дыхания рассчитывали относительно сырого веса листьев и выражали в нмоль поглощенного O₂/(мин г сырой массы).

Скорость поглощения кислорода растительным материалом в буферном растворе, не содержащем ингибиторов, была принята за общее дыхание ($V_{\text{общ}}$); в буферном растворе, содержащем KCN – за цианид-резистентное или альтернативное дыхание ($V_{\text{альт}}$); в буферном растворе, содержащем KCN и БГК – за остаточное дыхание ($V_{\text{ост}}$). Кроме того, вычисляли скорость поглощения кислорода в процентах от общего дыхания.

Процент цитохромного пути дыхания (%ЦП) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ЦП} = \left(\frac{V_{\text{общ}} - V_{\text{альт}}}{V_{\text{общ}}} \right) \times 100.$$

Процент альтернативного пути дыхания (%АП) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{АП} = \left(\frac{V_{\text{альт}} - V_{\text{ост}}}{V_{\text{общ}}} \right) \times 100.$$

Процент остаточного дыхания (%ОД) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ОД} = 100 - (\% \text{ЦП} + \% \text{АП}).$$

Для выявления развития окислительного стресса в листьях растений оценивали уровень генерации супероксидного аниона. Для этого использовали метод окрашивания с помощью NBT (AppliChem, Германия), основанный на образовании в присутствии супероксидного аниона формазана с последующей экстракцией и определением его содержания колориметрически на приборе SmartSpec Plus (BioRad, США) [31]. Итоговое значение содержания формазана было получено с поправкой на сырую массу образца.

Каждое измерение проводили не менее чем в трех биологических повторностях. Для статистической обработки данных использовали программы Statistica и SigmaPlot. Вычисляли среднее значение и доверительный интервал ($P = 0.05$). Статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения трансгенных растений табака транслируемую последовательность кДНК гена *NDB2* (AT4G05020) *A. thaliana* размером 1749 п.н. клонировали по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I в составе бинарной плазмиды pBI121, в которую предварительно был введен сайт узнавания *Kpn*I. Для повышения эффективности экспрессии целевого гена важно наличие нуклеотида А в положении –3 и нуклеотида G в положении +4 [32]. Для соответствия этим критериям проведена модификация 5'-концевого участка последовательности нативного гена *AtNDB2* – добавлена последовательность Козак ААСА перед стартовым кодоном. Также после стартового кодона был добавлен кодон GGT, кодирующий стабилизирующую аминокислоту валин. Стоп-кодон TGA был заменен на более предпочтительный для растений TAA. Созданный вектор получил название pBI121_ *NDB2* (рис. 2). С помощью секвенирования было показано полное соответствие целевой нуклеотидной последовательности векторной конструкции и референсной последовательности гена *A. thaliana* и отсутствие замен нуклеотидов в ней.

В результате эксперимента по агробактериальной трансформации растений табака вектором pBI121_ *NDB2* из каллусной культуры было получено 57 регенерантов. При достижении размера 2–3 см регенеранты срезали с каллуса и перенесли на среды с селективирующим агентом для укоренения. В процессе культивирования 28 регенерантов (49.1% от общего количества полученных регенерантов) образовывали корни и развивались на средах с селективным агентом канамицином.

Для подтверждения интеграции в геном трансформированных растений табака последовательности целевого гена под контролем промотора

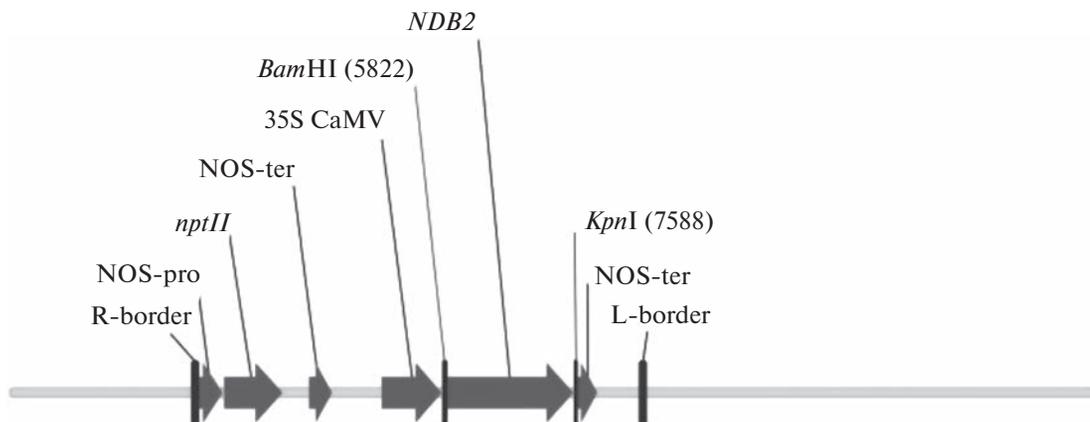


Рис. 2. Схема векторной конструкции рВ1121_НДВ2: R-border, L-border – правый и левый концевые повторы области Т-ДНК; NOS-pro – промотор нопалин-синтазы; *nptII* – селективный ген неомицинфосфотрансферазы II типа, определяющей устойчивость к канамицину; NOS-ter – терминатор нопалин-синтазы; 35S CaMV – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; *NDB2* – ген “внешней” нефосфорилирующей НАД-Н дегидрогеназы; *Bam*HI, *Kpn*I – сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции.

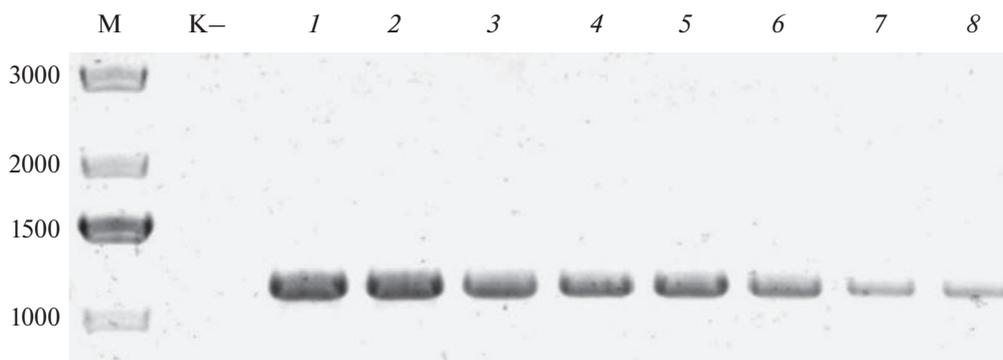


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продукта, выявленного при амплификации ДНК регенерантов табака со вставкой гена *NDB2 A. thaliana*. М – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); К – нетрансформированные растения табака; 1 – плаزمида рВ1121_НДВ2; 2 – 8 – анализируемые трансгенные линии.

35S РНК CaMV провели ПЦР-анализ с олигонуклеотидами 35SEF и Ndb2gR (Дополнительные материалы, табл. 1). Амплификация фрагмента размером около 1300 п.н. подтвердила наличие анализируемой вставки ДНК в геноме трансгенных растений табака (рис. 3).

Экспрессию целевого гена в трансформированных растениях исследовали как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Анализ с помощью ПЦР-РВ экспрессии гетерологичного гена *NDB2 A. thaliana* в трансформированных Т4-растениях табака типичной линии 13s показал высокий уровень экспрессии трансгена – примерно в 34 раза ($\log_2 = 5.1$) выше экспрессии собственного гена *NDB2* табака (рис. 4а).

Согласно данным Western blot, в общих белковых экстрактах из листьев табака собственный белок *NDB2* в контрольных и трансгенных растениях не детектировался, выявлялся только продукт

введенного гена арабидопсиса в трансформированных растениях (рис. 4б). Эти данные подтверждают, что в полученных трансгенных растениях экспрессия гетерологичного гена существенно выше экспрессии собственного гена *NDB2* табака.

Сравнительная оценка скорости роста показала, что, судя по изменению площади листовой пластинки, трансформированные растения уступают в темпах роста растениям дикого типа при выращивании при 20°C на 14, 18 и 21 сут и при выращивании при 25°C на 21 сут (рис. 5). На скорость роста также влияла температура выращивания: начиная с 14 сут у выращенных при 20°C растений площадь листовой пластинки была меньше, чем у растений, выращенных при 25°C. Такой эффект наблюдался как у растений дикого типа, так и у линии 13s.

Оценка скорости поглощения кислорода показала некоторые различия в скорости дыхания

между опытными растениями (рис. 6). Значимые различия были выявлены в скорости альтернативного дыхания ($V_{\text{альт}}$) между растениями дикого типа и трансформантами, выращенными при 20°C (рис. 6а), при этом $V_{\text{альт}}$ оказалась выше у растений линии 13s. Скорость общего дыхания у 13s растений была достоверно выше при выращивании при 20°C (рис. 6а). Значимых различий не обнаружено в скорости дыхания в отсутствие ингибиторов и в скорости цитохромного и остаточного дыхания и вкладов цитохромного и альтернативного дыхания (рис. 6б).

Между растениями дикого типа и трансформантами не обнаружено различий в уровне генерации супероксидного аниона в листьях (рис. 7). Также оно было одинаковым у трансформированных растений, выращенных при разной температуре. Однако, по сравнению с растениями, выращенными при 25°C, у растений дикого типа, выращенных при 20°C, уровень генерации супероксидного аниона оказался выше, что свидетельствует о развитии окислительного стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате агробактериальной трансформации были получены трансгенные растения табака с повышенной экспрессией гетерологичного гена *NDB2 A. thaliana*, характеризующиеся как высоким содержанием транскрипта, так и белкового продукта целевого гена, чего, согласно литературным данным, не всегда удается добиться [33]. Базовый уровень экспрессии собственного гена *NDB2* табака был низким, вследствие чего белковый продукт этого гена в экстрактах листьев не детектировался, в отличие от продукта трансгена (рис. 4).

Наблюдались фенотипические различия между трансформированными и контрольными растениями, выражающиеся в различной скорости роста (рис. 5): у растений табака с гиперэкспрессией *NDB2 A. thaliana* скорость роста была ниже, чем у нетрансформированных растений. Особенно ярко такие различия проявились при выращивании растений в условиях субоптимальной температуры 20°C. Трансформанты отставали в скорости роста в нормальных условиях на 21 сут, а при 20°C – начиная с 14 сут (рис. 5). Наблюдаемое торможение ростовых процессов в растениях табака при действии субоптимальной температуры – один из характерных признаков стрессовой реакции и, скорее всего, относится к адаптивной реакции в ответ на снижение температуры. В пользу такого предположения свидетельствуют данные Yang с соавт. [25] показавших, что у растений табака в результате длительного воздействия субоптимальной температуры повышается содержание растворимых клеточных белков и снижается степень повреждения клеточ-

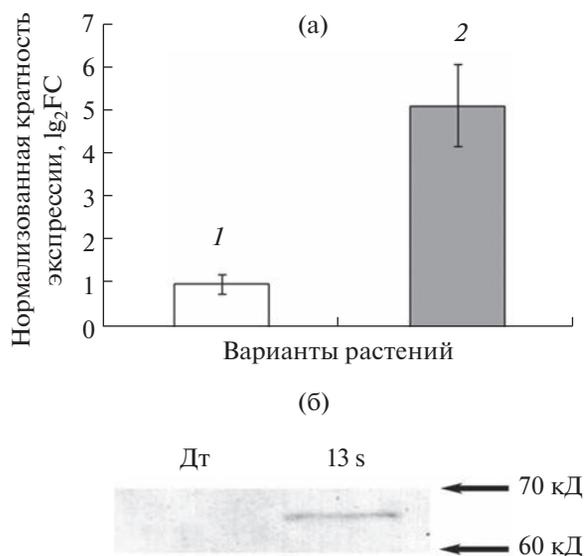


Рис. 4. Содержание мРНК гена *NDB2 A. thaliana* и белка *NDB2* в листьях табака. (а) – сравнительный анализ количества мРНК гена *NDB2* арабидопсиса в трансгенных растениях табака линии 13s. 1 – контрольные растения, 2 – трансгенные растения. Приведены средние значения и стандартные отклонения ($n = 14$); (б) – содержание *NDB2* в листьях табака по результатам Western blot. 13s – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; Дт – дикий тип. Справа приведены значения молекулярных масс маркерных белков.

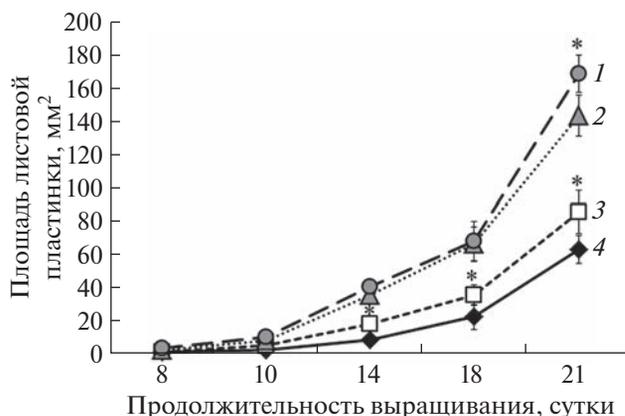


Рис. 5. Изменение площади листовой пластинки у растений табака дикого типа и трансформантов на разные сутки от начала выращивания. 1, 3 – дикий тип; 2, 4 – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; 1, 2 – выращивание при 25°C; 3, 4 – выращивание при 20°C. Площадь листьев (мм²) измеряли с помощью программы ImageJ. Приведены средние значения и доверительные интервалы ($P < 0.05$, $n = 3$). * – различия статистически значимы при $P < 0.05$. Статистическую значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни в программе Statistica.

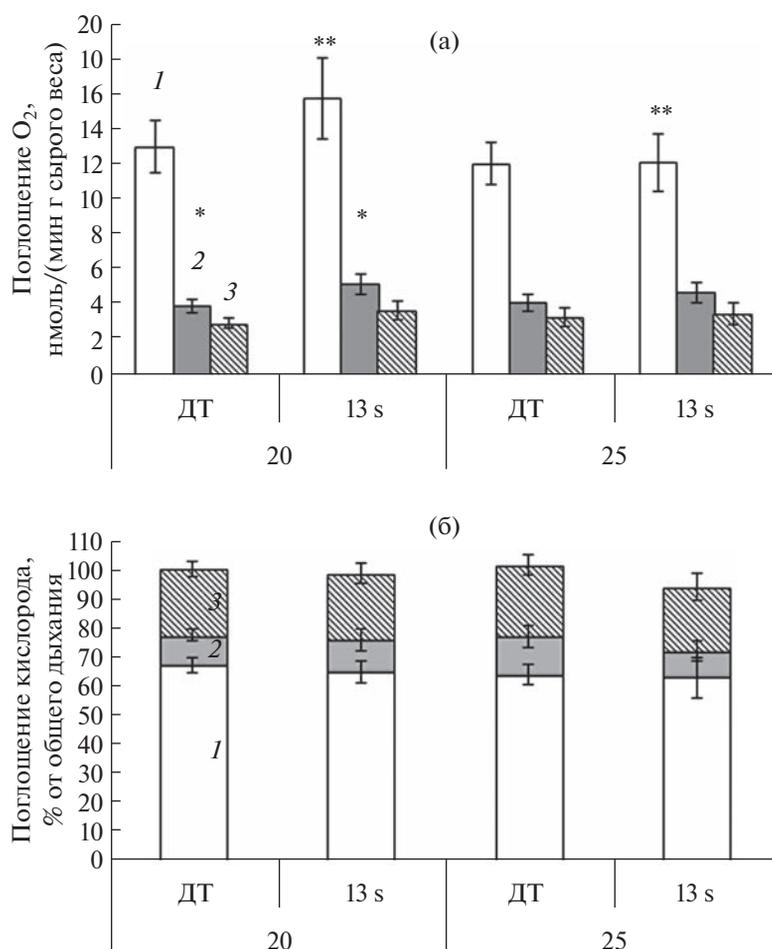


Рис. 6. Влияние температуры выращивания на дыхательную активность листьев табака. (а) – скорость дыхания, выраженная в нмоль поглощения кислорода. Показана величина поглощения O_2 в ходе общего (1), альтернативного (2) или остаточного дыхания (3). *, ** – различия статистически значимы при $P < 0.05$ ($p = 0.004$ и $p = 0.024$ соответственно; использован U -критерий Манна–Уитни); (б) – скорость дыхания, выраженная в процентах от общего поглощения кислорода в ходе активности цитохромного (1), альтернативного пути дыхания (2) или остаточного дыхания (3). 13s – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; Дт – дикий тип; 20 – выращивание при 20°C в течение 28 сут; 25 – выращивание при 25°C в течение 21 сут. Измерение скорости поглощения кислорода проводили в полярнографической ячейке при температуре 20°C или 25°C, соответственно. Приведены средние значения, ошибки представлены доверительным интервалом, $n = 18–25$.

ных мембран, возможно, вследствие снижения уровня АФК. Все эти эффекты наблюдались на поздних этапах вегетации (стадия развития 12 листа) и приводили к замедлению увядания растений и продлению вегетативной фазы развития.

В наших экспериментах, проводившихся на ранних этапах развития растений, наоборот, активные ростовые процессы сопровождались повышенным уровнем генерации супероксидного аниона в нетрансформированных растениях при действии субоптимальной температуры 20°C (рис. 7), что свидетельствует о развитии внутриклеточного окислительного стресса. В случае трансгенных растений табака достоверных различий в содержании формазана не обнаружено (рис. 7).

Такие различия в реакции на стрессовое воздействие пониженной температурой могут определяться повышенной экспрессией трансгена. Считается, что экспрессия генов *NDB* и *AOX* (альтернативной оксидазы) растений взаимосвязаны. Уровень экспрессии *AOX1a* у *A. thaliana* определяет уровень экспрессии гена *AtNDB2* в контроле и в условиях повышенного УФ облучения [34]. Экспрессия этих генов происходит синхронно в ответ на различные абиотические стрессы, что предполагает совместную регуляцию общими промоторными элементами [19, 35, 36]. В связи с этим не удивительно, что в трансгенных растениях табака *N. sylvestris* с гиперэкспрессией гена *StNDB1* картофеля (*Solanum tuberosum* L.) наблюдалось

повышение активности собственной АОХ [37]. Схожий эффект наблюдался ранее в ряде аналогичных трансгенных линий в работе Sweetman с соавт. [14].

Координированная экспрессия генов *NDB2* и *АОХ* и совместная работа кодируемых ими белков обеспечивает формирование полноценного функционального нефосфорилирующего пути транспорта электронов [14]. Вероятно, в полученных нами трансгенных растениях табака также вследствие повышенной экспрессии *NDB2 A. thaliana* наблюдается активация дыхания через НФП (*NDB2 – Q/QH2 – АОХ*), поскольку скорость альтернативного дыхания у трансформантов, выращенных при 20°C, оказалась достоверно выше, чем у растений дикого типа, выращенных при такой же температуре (рис. 6а). Вероятно это повышение скорости альтернативного дыхания и определяет сниженный уровень АФК в трансгенных растениях.

В наших экспериментах даже воздействие субоптимальной температурой на растения приводит к выраженному росту скорости общего дыхания у трансгенных растений (рис. 6а), что лишний раз подтверждает защитную функцию НФП при охлаждении – предотвращение перевосстановления пула убихинола и образования избытка АФК в митохондриальной ЭТЦ и рассеяние энергии дыхания в виде тепла [38].

Как следствие, фенотипические различия скорости роста трансгенных и нетрансформированных растений могут быть также следствием разобщения дыхания и активизации НФП в результате снижения энергетической эффективности дыхания, которое в некоторых условиях приводит к снижению скорости роста и продуктивности [14, 39]. Другим возможным объяснением низкой скорости роста в сочетании с повышенной скоростью дыхания у трансгенных растений может быть перенаправление энергетического вклада дыхания на другие нужды, помимо роста. Например, показано, что благодаря активности АОХ рост суспензионной культуры клеток табака может настраиваться на снижение доступности азота и фосфора в среде культивирования, при этом сокращается вклад потребляемого сахара в прирост культуры [40]. В таком случае зависимость скорости роста трансгенных растений от повышения активности *AtNDB2* (и, возможно, от активности АОХ) представляется специфической настройкой, призванной оптимизировать соотношение дыхания, ростовых и адаптационных затрат.

Таким образом, нами получены трансгенные растения табака с измененной экспрессией гена, кодирующего один из ключевых компонентов альтернативного пути переноса электронов в митохондриях – *AtNDB2*, характеризующиеся более

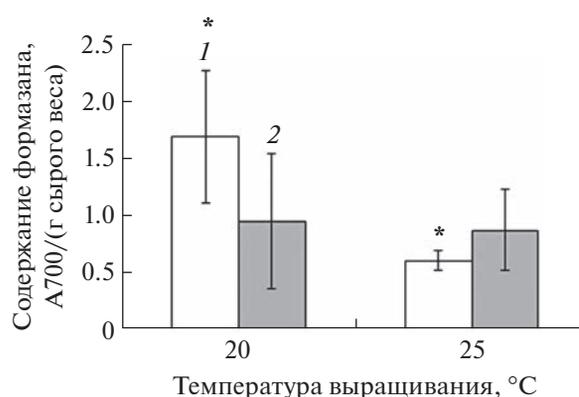


Рис. 7. Влияние температуры выращивания на уровень генерации супероксидного аниона в листьях табака. 1 – дикий тип; 2 – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; 20 – выращивание при 20°C в течение 28 сут; 25 – выращивание при 25°C в течение 21 сут. Приведены средние значения, ошибки представлены доверительным интервалом, $n = 3-5$. * – различия статистически значимы при $P < 0.05$ (использован *U*-критерий Манна–Уитни).

низкой по сравнению с растениями дикого типа скоростью роста, снижающейся еще больше при действии субоптимальной температуры. Замедление роста, а также наблюдаемое у трансгенных растений в отличие от контрольных снижение уровня генерации супероксидного аниона сопровождаются усилением общего и альтернативного дыхания. Разобщение дыхания и активизация НФП, вероятно, снижают энергетическую эффективность дыхания и, как следствие определяют наблюдаемые фенотипические различия в скорости роста трансгенных и нетрансформированных растений. Полученные растения с повышенной экспрессией гена *AtNDB2*, кодирующего внешнюю NADH дегидрогеназу *A. thaliana*, являются интересной моделью для изучения температурных настроек и стрессовых реакций растений.

Авторы выражают благодарность анонимным рецензентам. Авторы выражают благодарность О.И. Грабельных и Е.А. Поляковой за помощь и ценные рекомендации при исследовании дыхательной активности. Для выполнения работы было использовано оборудование Центра коллективного пользования “Биоаналитика” СИФИБР СО РАН.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00097, <https://rscf.ru/project/23-24-00097/>.

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. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. P. 405. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
2. *Gill S.S., Tuteja N.* Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. P. 909. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
3. *Nadarajah K.K.* ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 15. P. 5208. <https://doi.org/10.3390/ijms21155208>
4. *Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R.* Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. V. 14. № 6. P. 691. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.014>
5. *Hu C.-H., Wang P.-Q., Zhang P.-P., Nie X.-M., Li B.-B., Tai L., Liu W.-T., Li W.-Q., Chen K.-M.* NADPH oxidases: the vital performers and center hubs during plant growth and signaling // *Cells.* 2020. V. 9. № 2. P. 437. <https://doi.org/10.3390/cells9020437>
6. *Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J.* Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. № 1. P. 185. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x>
7. *Kristiansen K.A., Jensen P.E., Møller I.M., Schulz A.* Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H2DCFDA and confocal laser microscopy // *Physiol. Plant.* 2009. V. 136. № 4. P. 369. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01243.x>
8. *Bartoli C.G., Gómez F., Martínez D.E., Guíamet J.J.* Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. № 403. P. 1663. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh199>
9. *Amirsadeghi S., Robson C.A., Vanlerberghe G.C.* The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. № 1. P. 253. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00775.x>
10. *Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R.* ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. № 2. P. 259. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.014>
11. *Blokhina O., Fagerstedt K.V.* Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. № 5. P. 359. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.007>
12. *Michalecka A.M., Svensson A.S., Johansson F.I., Agius S.C., Johanson U., Brennicke A., Binder S., Rasmusson A.G.* Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. № 2. P. 642. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024208>
13. *Elhafez D., Murcha M.W., Clifton R., Soole K.L., Day D.A., Whelan J.* Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: intraorganellar location and expression // *Plant Cell Physiol.* 2006. V. 47. № 1. P. 43. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci221>
14. *Sweetman C., Waterman C.D., Rainbird B.M., Smith P.M.C., Jenkins C.D., Day D.A., Soole K.L.* AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress // *Plant Physiol.* 2019. V. 181. № 2. P. 774. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00877>
15. *Stupnikova I., Benamar A., Tolleter D., Grelet J., Borovskii G., Dorne A.J., Macherel D.* Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. № 1. P. 326. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073015>
16. *Fedoseeva I.V., Pyatrikas D.V., Stepanov A.V., Fedyaeva A.V., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Borovskii G.B., Rikhvanov E.G.* The role of flavin-containing enzymes in mitochondrial membrane hyperpolarization and ROS production in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02736-7>
17. *Fang J., Beattie D.S.* External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. V. 34. № 4. P. 478. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01328-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01328-x)
18. *Carneiro P., Duarte M., Videira A.* Characterization of apoptosis-related oxidoreductases from *Neurospora crassa* // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. P. e34270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034270>
19. *Smith C., Barthet M., Melino V., Smith P., Day D., Soole K.* Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. № 7. P. 1222. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr073>
20. *Wallström S.V., Florez-Sarasa I., Araújo W.L., Escobar M.A., Geisler D.A., Aidemark M., Lager I., Fernie A.R., Ribas-Carbó M., Rasmusson A.G.* Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport // *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55. № 5. P. 881. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu021>
21. *Wallström S.V., Florez-Sarasa I., Araújo W.L., Aidemark M., Fernández-Fernández M., Fernie A.R., Ribas-Carbó M., Rasmusson A.G.* Suppression of the external mitochondrial NADPH dehydrogenase, NDB1, in *Arabidopsis thaliana* affects central metabolism and vegetative growth // *Mol. Plant.* 2014. V. 7. № 2. P. 356. <https://doi.org/10.1093/mp/sst115>
22. *Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Tauson E.L., Pobezhima T.P., Katyshev A.I., Pavlovskaya N.S., Koroleva N.A., Lyubushkina I.V., Bashmakov V.Y., Popov V.N., Borovskii G.B., Voinikov V.K.* Mitochondrial energy-dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings // *Biochem. (Mosc).* 2014. V. 79. № 6. P. 506. <https://doi.org/10.1134/S0006297914060030>

23. Allen D.J., Ort D.R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants // Trends Plant Sci. 2001. V. 6. № 1. P. 36.
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01808-2](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01808-2)
24. Aghaee A., Moradi F., Zare-Maivan H., Zarinkamar F., Irandoost H.P., Sharifi P. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage // African J. Biotechnol. 2011. V. 10. P. 7617.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.069>
25. Yang L.Y., Yang S.L., Li J.Y., Ma J.H., Pang T., Zou C.M., He B., Gong M. Effects of different growth temperatures on growth, development, and plastid pigments metabolism of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants // Bot. Stud. 2018. V. 59. № 5. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s40529-018-0221-2>
26. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.
27. Chen P.Y., Wang C.K., Soong S.C., To K.Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants // Mol. Breed. 2003. V. 11. № 4. P. 287.
<https://doi.org/10.1023/A:1023475710642>
28. Belide S., Vanhercke T., Petrie J.R., Singh S.P. Robust genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos // Plant Methods. 2017. V. 13. № 109. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s13007-017-0260-9>
29. Schmidt G.W., Delaney S.K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress // Mol. Genet. Genomics. 2010. V. 283. № 3. P. 233.
<https://doi.org/10.1007/s00438-010-0511-1>
30. 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>
31. Tarasenko V.I., Garnik E.Y., Shmakov V.N., Konstantinov Y.M. Modified alternative oxidase expression results in different reactive oxygen species contents in *Arabidopsis* cell culture but not in whole plants // Biol. Plant. 2012. V. 56. P. 635.
<https://doi.org/10.1007/s10535-012-0115-1>
32. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes // Cell. 1986. V. 44. P. 283.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90762-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90762-2)
33. Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast // Mol. Cell Biol. 1999. V. 19. № 3. P. 1720.
<https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.1720>
34. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Ermolina K.V., Rybak A.V., Malyshev R.V. Altered levels of AOX1a expression result in changes in metabolic pathways in *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation // Plant Sci. 2020. V. 291. P. 110332.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110332>
35. Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., Day D.A., Whelan J. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. № 2. P. 193.
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-5514-7>
36. Yoshida K., Noguchi K. Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves // Plant Cell Physiol. 2009. V. 50. № 8. P. 1449.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcp090>
37. Liu Y.J., Norberg F.E.B., Szilagy A., De Paepe R., Akerlund H.E., Rasmusson A.G. The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP(+) ratio in transgenic *Nicotiana sylvestris* // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 251.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcn001>
38. Gabelnych O.I. The energetic functions of plant mitochondria under stress // J. Stress Physiol. Biochem. 2005. V. 1. № 1. P. 37.
39. Guo M., Liu J., Hou L., Zhao S., Zhang N., Lu L., Zhao X. The mitochondria-localized protein OsNDB2 negatively regulates grain size and weight in rice // Crop J. 2022. V. 10. P. 1819.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.07.016>
40. Sieger S.M., Kristensen B.K., Robson C.A., Amirsadeghi S., Eng E.W., Abdel-Mesih A., Møller I.M., Vanlerberghe G.C. The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. № 416. P. 1499.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri146>

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОСВЕЩЕНИЯ ВЛИЯЕТ НА СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ СУММАРНЫХ ЛИПИДОВ ЛИСТЬЕВ И КОРНЕЙ БАЗИЛИКА (*Ocimum basilicum* L.)

© 2023 г. Т. В. Иванова^а, *, А. С. Воронков^а

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

*e-mail: itv_2006@mail

Поступила в редакцию 13.03.2023 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 26.03.2023 г.

Исследованы вегетативные органы базилика обыкновенного (*Ocimum basilicum* L.), выращенного в водной культуре при разных уровнях освещения (50, 100 и 150 мкмоль квантов ФАР/(м² с)) в течение 21 сут. В работе использовали популярный в агрокультуре сорт базилика “Фиолетовый бархат”, имеющий интенсивно окрашенные листья. Определяли биомассу, содержание воды и состав жирных кислот (ЖК) суммарных липидов в листьях и корнях растений и содержание малонового диальдегида и хлорофиллов (*a*, *b*) в надземной части растений. Показана чувствительность состава ЖК и морфофизиологических показателей (биомассы и содержания хлорофилла в листьях) растений *O. basilicum* к интенсивности освещения. Наибольший эффект вызывал режим интенсивности освещения 150 мкмоль/(м² с). Видовой состав ЖК *O. basilicum* при всех режимах освещения был шире в липидах корней, однако более выраженные изменения в качественном составе ЖК наблюдались в листьях. Фотозависимая регуляция компонентного состава ЖК *O. basilicum* проявлялась в увеличении доли ненасыщенных ЖК, особенно полиеновых, что приводило к повышению индекса ненасыщенности (ИН) этерифицированных ЖК липидов. Наибольшие показатели ИН получены при освещении 150 мкмоль/(м² с). При этом с увеличением интенсивности освещения происходило достоверное увеличение активности ω-3 и ω-9-десатураз, что свидетельствует в пользу их светозависимой активации. Таким образом, повышение интенсивности освещения до определенных величин прямо пропорционально влияет на физиологические показатели *O. basilicum*. Максимальные показатели продуктивного роста и реализация адаптационных механизмов зеленых и подземных частей растений базилика соответствуют освещению 150 мкмоль/(м² с).

Ключевые слова: *Ocimum basilicum*, адаптация, активность десатураз, жирные кислоты с очень длинной цепью, интенсивность освещения

DOI: 10.31857/S0015330323600249, **EDN:** WWYTNQ

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая потребность в натуральной пище способствует усовершенствованию различных искусственных систем для производства сельскохозяйственной продукции. С целью повышения эффективности необходима оптимизация и контроль всех условий выращивания культурных растений. Одним из главных факторов, контролирующих рост, морфогенез и сроки достижения отдельных этапов развития растений, является свет — его качество, интенсивность и длительность облучения. Выращивание растений в закрытом грунте с использованием различных технологий возделывания позволяет влиять на метаболизм растений и регулировать его для получения необходимых характеристик. Повышение эффективности выращивания растений в светокультуре во многом

связано с внедрением прогрессивных технологий, предусматривающих, в частности, оптимизацию светового режима, позволяющего регулировать метаболизм с помощью различного состава и интенсивности света. В качестве освещения широко используют современные источники света на основе светодиодов, люминесцентные, натриевые, ртутные, индукционные лампы с высоким световым потоком в необходимой для растений синей и красной областях спектра [1, 2]. Однако, в тепличных хозяйствах по-прежнему широко применяются хорошо зарекомендовавшие себя и дешевые люминесцентные лампы. Адаптация к световому режиму затрагивает различные уровни организации растения, в первую очередь — пигментный комплекс и образующие его структуры, которые обеспечивают поглоще-

ние и превращение энергии [3, 4]. При оптимальном освещении активируются ростовые процессы, увеличивается биомасса и пищевая ценность растительной продукции. В зависимости от интенсивности, инсоляция может быть для растения как благоприятным фактором, увеличивающим продуктивность растения в целом, так и неблагоприятным — обладающим повреждающим эффектом. Свет высокой интенсивности является основным стрессовым фактором, который отрицательно влияет на функцию фотосинтетического аппарата [5]. В тепличных хозяйствах используют освещение люминесцентными лампами относительно низкой интенсивности (50–200 мкмоль квантов ФАР/(м² с)). Известно, что в формировании устойчивости растений к различным биотическим и абиотическим факторам среды важная роль принадлежит липидам [6]. Адаптация организма растения в значительной степени обусловлена стабильностью липидных компонентов клеточных мембран. Способность клеток растений формировать и поддерживать необходимую текучесть мембран при выращивании в условиях разной освещенности является необходимой составляющей устойчивости растения в целом.

Структура и функции мембран во многом определяются составом жирных кислот (ЖК) липидов. Изменение состава ЖК липидов высших растений связывают с изменениями физических свойств биологических мембран, поддержанием их жидкокристаллического состояния, активностью мембранных ферментов и, в итоге, с ростом и развитием растений. Одним из механизмов адаптивного ответа растений на абиотические стрессовые факторы является модуляция ЖК-состава мембранных липидов. Исследования подобных изменений в составе суммарных липидов вегетативных частей растений позволяют определить границы воздействия внешних факторов, таких как световой режим, дающих максимальный экономический эффект и не приводящих к повреждению клеток растений.

Одной из популярных культур, которую выращивают в открытом и закрытом грунте, является базилик — *Ocimum basilicum* L. [7]. К главным полезным потребительским свойствам базилика можно отнести образование в его биомассе эфирных масел. Также базилик — удобное экспериментальное растение для исследования процессов приспособляемости организма к изменяющимся условиям среды. Выбор объекта нашего исследования связан с особой пластичностью данного растения, быстро реагирующего на изменение интенсивности и спектрального состава света [2, 3]. Лучшее всего изучен ЖК состав липидов семян *O. basilicum* [8, 9], в то время как наиболее интересные органы с точки зрения адапционных реакций целого растения — листья и корни — исследованы слабо. Представляет интерес изучение действия интенсивности света на ЖК мембранных липидов

при одновременном сопоставлении его с ростовыми и фотосинтетическими характеристиками растений. Тем не менее, данных о действии современных источников облучения на рост и развитие, активность фотосинтетического аппарата и адаптационные возможности растений и, в конечном итоге, на урожайность, все еще недостаточно.

Цель работы — сравнительное изучение разных режимов интенсивности (50, 100 и 150 мкмоль/(м² с)) освещения люминесцентными лампами на ЖК-состав суммарных липидов, морфофизиологические параметры (биомасса, сухое вещество), реакцию фотосинтетического аппарата (содержание хлорофиллов *a* и *b*) и показателя окислительно-восстановительного гомеостаза (количество малонового диальдегида) вегетативных органов (листьев и корней) базилика обыкновенного (*O. basilicum*) сорта “Фиолетовый бархат”, выращенного в водной культуре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследования было использовано растение *O. basilicum* L. — однолетнее лекарственное пряно-ароматическое растение из семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) сорта “Фиолетовый бархат” (агрофирма “Седек”). Семена высевали в контейнеры с влажным перлитом и при появлении всходов добавляли разбавленную (0.5 нормы) питательную среду Hoagland [10]. На фазе второй пары настоящих листьев проростки *O. basilicum* переносили в сосуды с питательной средой Hoagland с модификациями (10 мМ KNO₃, 7.4 мМ KH₂PO₄, 4.1 мМ MgSO₄ · 7H₂O, 4.2 мМ Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 1.77 мкМ MnSO₄ · 5H₂O, 8.87 мкМ H₃BO₃, 1.0 мкМ ZnSO₄ · 7H₂O, 0.32 мкМ CuSO₄ · 5H₂O, 0.026 мкМ (NH₄)₆Mo₇O₂ · 4H₂O, 28.7 мкМ FeSO₄ · 7H₂O; pH 6.5 ± 0.2) и выращивали две недели в камере фитотрона в условиях 12-часового фотопериода и освещения люминесцентными лампами L36W/765 (“Philips”, Польша) при интенсивности света — 50 мкмоль/(м² с), температуре воздуха 22 ± 3°C и относительной влажности воздуха 65 ± 5%. Спектр излучения люминесцентных ламп был измерен на спектрометре USB2000 (“OceanOptics”, США) и имел два максимума — в синей (445 нм) и красной (583 нм) областях. Интенсивность освещения люминесцентных ламп измеряли люксметром Li-250A (“Li-COR”, США). Питательную среду в сосудах меняли каждые 5–6 сут. По окончании срока выращивания часть *O. basilicum* фиксировали как исходные (контроль). Далее растения разделили на три группы и поместили в условия различной интенсивности освещения (50 мкмоль/(м² с), 100 мкмоль/(м² с) и 150 мкмоль/(м² с)) и продолжали выращивать в течение 21 сут.

Определение морфофизиологических и некоторых биохимических параметров. Биомассу листьев *O. basilicum* определяли гравиметрическим методом с точностью до 0.01 мг (Scout STX “ОНАУС”, США). Для определения количества сухого вещества навески листьев и корней *O. basilicum* помещали в нумерованные бюксы и держали в сушильном шкафу при температуре 70°C до достижения постоянной массы.

Содержание хлорофиллов (*a*, *b*) определяли по методу Lichtenthaler [11]. Для этого проводили экстракцию пигментов 80% ацетоном в 3–4-кратной повторности до полного обесцвечивания образцов при +4°C. Определение оптической плотности экстрактов вели при длинах волн 470, 648 и 663 нм на спектрофотометре Genesys 10 uv (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли, используя метод Heath и Packer [12], который основывается на формировании окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой при нагревании. Концентрацию продуктов реакции определяли спектрофотометрически при измерении оптической плотности на спектрофотометре Genesys 10 uv (“Thermo Fisher Scientific”, США) при длинах волн 532 нм и 600 нм. В качестве стандарта использовали раствор 1,1,3,3-tetramethoxypropane (108383 “Sigma”, Германия) в деионизированной воде.

Определение состава ЖК суммарных липидов. ЖК-состав липидов *O. basilicum* исследовали отдельно для листьев и корней. Пробы фиксировали в кипящем изопропанол, содержащем 0.001% ионола (butylated hydroxytoluene 34750 “Sigma-Aldrich”, Германия) в качестве антиоксиданта в течение 30 мин (предварительно смыв хлороформом поверхностные воска). Для анализа использовали средние листья с черешками без стеблей и корни целиком. Растительный материал механически гомогенизировали в ступке и полностью экстрагировали суммарные липиды с использованием хлороформа и метанола в двух системах — нейтральной и кислой [13]. Экстракт доводили до объема 200 мл в мерной колбе и добавляли аммиак до нейтральной реакции. Далее аликвоту экстракта суммарных липидов подвергали щелочному гидролизу в 4% этанольном растворе NaOH, неомыляемые вещества отделяли гексаном методом декантации и более в работе не использовали. После омыления раствор доводили до кислой реакции, ЖК экстрагировали гексаном и конвертировали в метиловые эфиры ЖК (МЭЖК) кипячением с обратным холодильником с использованием метанола и ацетилхлорида. МЭЖК выделяли гексаном, выпаривали на ротационном испарителе и добавляли минимальный объем растворителя. Для получения чистых МЭЖК использовали фракционирование методом препаративной ТСХ на промытых

ацетоном с метанолом (1 : 1) пластинах 150 × 150 мм (“Силуфол”, Чехия) в системе гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота — 8 : 2 : 0.1 до верха пластинок в закрытой стеклянной камере. Зону чистых МЭЖК обнаруживали в УФ-свете при длине волны 365 нм на пластине с 0.001% водно-спиртовом растворе дихлорфлуоресцеина, нанесенном дисперсным путем. Обнаруженные МЭЖК переносили с пластины на стеклянный фильтр и экстрагировали чистым хлороформом, который далее замещали гексаном [14].

Идентификацию и количественное определение МЭЖК проводили методом ГЖХ-МС [15] на приборе Agilent 7890FGC (“Agilent Technologies Inc.”, США) с 60-метровой капиллярной колонкой с внутренним диаметром 0.25 мм. Условия разделения МЭЖК: давление газа-носителя (гелия) в инжекторе — 191 кПа; рабочее давление газа в колонке — 245 кПа; расход газа — 1 мл/мин; линейная скорость газа-носителя в колонке — 18 см/с; объем раствора образца — 1 мкл (около 10 мкг МЭЖК); делитель потока — 1 : 5, температура испарителя 260°C. Программа градиента температуры колонки: от 130 до 170°C со скоростью 6.5°C/мин, от 170 до 215°C со скоростью 2.75°C/мин, выдержка при 215°C в течение 25 мин, от 215 до 240°C со скоростью 40°C/мин и выдержка при 240°C в течение 50 мин. Рабочая температура МС-детектора — 240°C. Для идентификации индивидуальных видов МЭЖК и расчета их количественного содержания в смесях использовали расширенный пакет встроенных рабочих программ MSD ChemStation с библиотекой спектров NIST [16].

Индекс ненасыщенности (ИН), характеризующий относительное содержание ненасыщенных ЖК в общем составе всех этерифицированных ЖК, вычисляли по формуле $ИН = \sum P_i e_i / 100$, где P_i — содержание P_i -ой ЖК (%), e_i — число двойных связей в i -той ЖК [13]. Активность десатураз оценивали как стеароил- (СДО), олеоил- (ОДО) и линолеилдесатуразные (ЛДО) отношения, рассчитанные, как описано ранее [15].

Данные получены в трех биологических и 3–5 аналитических повторностях. Представленные в таблицах и на графиках данные отображают средние арифметические значения и их стандартные отклонения. В качестве статистической обработки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ. Разными буквами указаны достоверно отличающиеся величины при $P < 0.05$ (тест Тьюки).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биомасса и сухое вещество *O. basilicum*. Обнаружено, что растения *O. basilicum*, культивируемые в течение 21 сут на интенсивности света 50 и

Таблица 1. Влияние различной интенсивности освещения на морфофизиологические и некоторые биохимические параметры контрольных и опытных растений *O. basilicum* L.

Параметры	Контроль	Экспозиция 21 сут		
		50 мкмоль/(м ² с)	100 мкмоль/(м ² с)	150 мкмоль/(м ² с)
<i>Надземные части</i>				
Сырая масса, г	1.62 ± 0.29 ^c	6.07 ± 1.25 ^b	7.38 ± 0.96 ^b	9.38 ± 0.93 ^a
Сухое вещество в листьях, %	6.65 ± 0.29 ^b	6.78 ± 0.31 ^b	7.51 ± 0.28 ^a	7.57 ± 0.34 ^a
МДА, нмоль/г сырой массы	8.01 ± 0.33 ^c	9.34 ± 0.31 ^c	13.08 ± 0.62 ^b	24.21 ± 1.56 ^a
Отношение хлорофиллов, a/b	2.92 ± 0.06 ^c	3.14 ± 0.07 ^b	3.37 ± 0.05 ^b	3.47 ± 0.02 ^a
<i>Корни</i>				
Сырая масса, г	0.45 ± 0.09 ^d	1.73 ± 0.43 ^c	2.29 ± 0.38 ^b	3.32 ± 0.34 ^a
Содержание сухих веществ, %	6.54 ± 0.49 ^b	9.81 ± 0.42 ^a	8.81 ± 1.21 ^a	8.97 ± 0.44 ^a

Примечание. Разными буквами указаны достоверно отличающиеся величины при $P < 0.05$.

100 мкмоль/(м² с), характеризовались более низкими значениями биомассы, которая достоверно увеличивалась у растений, выращенных при интенсивности света 150 мкмоль/(м² с) (табл. 1). При всех вариантах освещения растения *O. basilicum* показали увеличение сырой массы листьев и корней по сравнению с контрольным в ≈ 4 раза. Аналогичная картина наблюдалась и для корней — их масса увеличилась в 5.1 и 7.4 раз на интенсивности освещения 100 и 150 мкмоль/(м² с) соответственно. В итоге, биомасса листьев и корней, фотоиндуцированных светом 150 мкмоль/(м² с) в 1.5 и в 1.9 раз, соответственно, оказалась выше, чем растения такого же возраста, но выращенные при 50 мкмоль/(м² с). Содержание сухого вещества вегетативных органов было достоверно выше при интенсивности освещения 100 и 150 мкмоль/(м² с). Можно заключить, что для большего накопления биомассы растений базилика наиболее благоприятным из изученных является режим интенсивности освещения 150 мкмоль/(м² с).

Содержание хлорофиллов a и b в листьях *O. basilicum* L. Содержание хлорофилла a было значительно выше, чем хлорофилла b, во всех вариантах интенсивности освещения (рис. 1). Только трехкратное увеличение интенсивности света (относительно 50 мкмоль/(м² с)) способствовало достоверному увеличению содержания суммы хлорофиллов a и b в опытных растениях (рис. 1). За 21 сутки экспозиции эти показатели повысились по отношению к контрольным значениям в среднем в ≈ 1.2 (при интенсивности света 50 и 100 мкмоль/(м² с)) и 1.58 раза — 150 мкмоль/(м² с). Наиболее значительное повышение содержания хлорофилла a в листьях базилика наблюдали в условиях интенсивности света 150 мкмоль/(м² с), о чем свидетельствует и величина отношения хлорофиллов a/b (табл. 1).

Содержание МДА в листьях базилика. При инкубации растений на свету разной интенсивности количество МДА увеличивалось прямо пропорционально этому показателю. Контрольные и опытные растения, выращенные при интенсивности освещения 50 мкмоль/(м² с), достоверно не отличались по содержанию МДА (табл. 1). Максимальные значения концентрации МДА зарегистрированы при культивировании растений при 150 мкмоль/(м² с).

Состав и содержание жирных кислот суммарных липидов в корнях и листьях *O. basilicum*. Суммарные липиды листьев контрольных растений были представлены 16 видами индивидуальных C₁₂₋₂₀

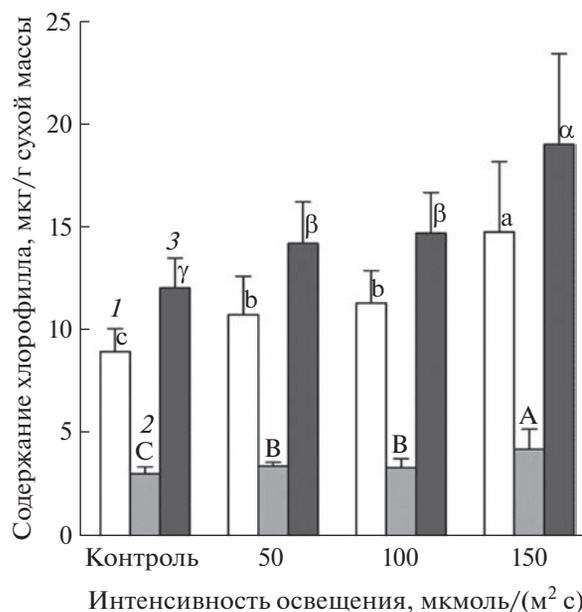


Рис. 1. Содержание хлорофиллов a (1), b (2) и их сумма (3) в листьях *O. basilicum* L., выращенного при разной интенсивности освещения. Разными буквами отмечены достоверные отличия при $P < 0.05$.

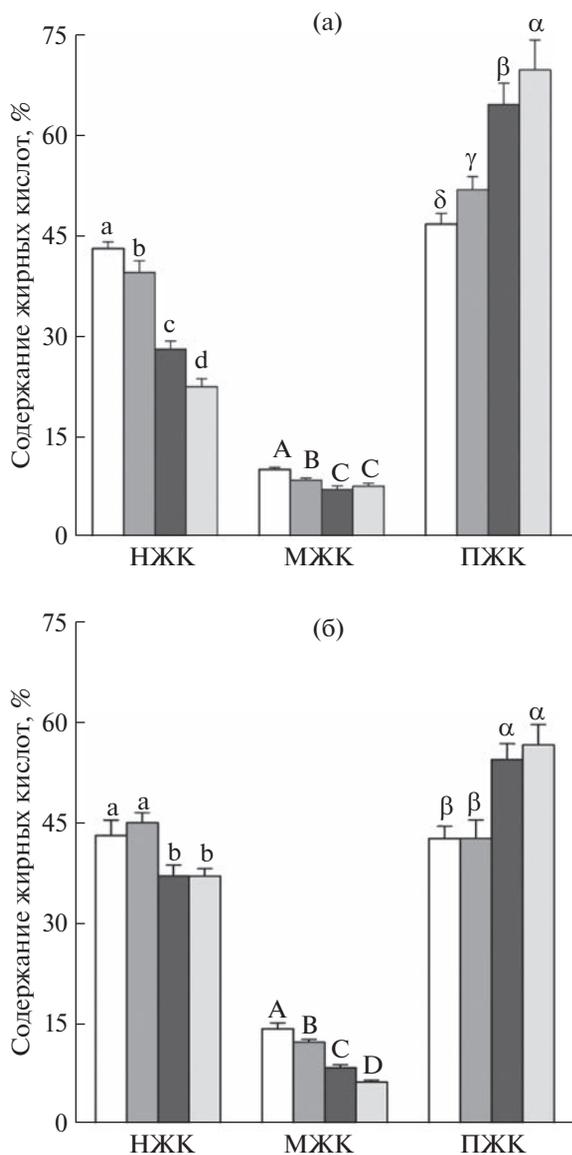


Рис. 2. Содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов в листьях (а) и корнях (б) *O. basilicum* L., выращенного при разной интенсивности освещения. 1 – контроль, 2 – 50 мкмоль/(м² с), 3 – 100 мкмоль/(м² с), 4 – 150 мкмоль/(м² с). Разными буквами отмечены достоверные отличия при $P < 0.05$.

ЖК. Главными были пальмитиновая (16:0), линолевая (9,12-18:2) и α -линоленовая (9,12,15-18:3) ЖК (табл. 2), относительное содержание которых в сумме составляло более 80% от общего количества всех ЖК. Необходимо также отметить пальмитолеиновую (9-16:1), стеариновую (18:0), олеиновую (9-18:1) и *cis*-вакценовую кислоты (11-18:1), которые относятся к минорным, т.к. доля каждой из вышеперечисленных была от ≈ 1 до 5% от общего количества всех ЖК. Остальные ЖК были найдены в количестве менее 1%.

Суммарные липиды корней контрольных растений *O. basilicum* были представлены 18 видами

индивидуальных C_{12-24} ЖК. Главными, как и в липидах листьев, были 16:0, 9,12-18:2, 9,12,15-18:3 (табл. 2), в сумме дающие немногим менее 70% от общего количества всех ЖК. Минорные 18:0, 9-18:1 и 11-18:1 в липидах корней *O. basilicum* содержались в количестве от ≈ 5 до 10% от общего количества всех ЖК. Также следует отметить пентадекановую (15:0) и арахидоновую (20:0) ЖК, доля которых в суммарных липидах корней была 1.31 и 2.97%, соответственно. Остальные индивидуальные ЖК были найдены в количестве, которое не превышало 1% от всех ЖК.

Условия различной интенсивности освещения (50 мкмоль/(м² с), 100 мкмоль/(м² с) и 150 мкмоль/(м² с)) привели к некоторым изменениям качественного состава ЖК суммарных липидов листьев *O. basilicum*. Так, растения, которые выращивали 21 день при интенсивности освещения 50 мкмоль/(м² с), достоверно отличались от контрольных только увеличением доли миристиновой (14:0), *cis*-гексадеценной (7-16:1) и 20:0 ЖК (табл. 2), доля остальных ЖК оставалась неизменной. Липиды листьев *O. basilicum*, росшего при интенсивности освещения 100 мкмоль/(м² с), показали снижение количества индивидуальных видов ЖК до 12, достоверное уменьшение доли лауриновой (12:0), 14:0, 15:0, 16:0, 7-16:1, 20:0 и увеличение 9,12,15-18:3 ЖК относительно контроля (табл. 2). Суммарные липиды листьев *O. basilicum*, подвергавшегося интенсивности освещения 150 мкмоль/(м² с), имели в составе 15 индивидуальных видов ЖК, достоверное увеличение 9,12,15-18:3, 20:0 и эйкозодиеновой (11,14-20:2) ЖК, а также уменьшение доли 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 7-16:1, 18:0 относительно контроля (табл. 2). Таким образом, мы видим, что с увеличением интенсивности освещения в липидах листьев *O. basilicum* уменьшается доля отдельных насыщенных (НЖК) и совсем немного мононенасыщенных ЖК (МЖК), а также сильно увеличивается количество полиненасыщенных ЖК (ПЖК) (рис. 2а), а также происходит изменение качественного состава ЖК суммарных липидов (табл. 2).

Различная интенсивность освещения привела также к изменениям в составе ЖК липидов корней *O. basilicum*. При интенсивности освещения 50 мкмоль/(м² с) изменения коснулись лишь минорных ЖК. Так, достоверно уменьшалось содержание 15:0 и увеличивалось содержание бегеновой (22:0) ЖК относительно контроля (табл. 2). Рост *O. basilicum* при интенсивности освещения 100 мкмоль/(м² с) достоверно увеличил количество 12:0, 9,12-18:2, а также уменьшил долю 14:0, 15:0 и нонадекановой (19:0) ЖК. Интенсивность освещения 150 мкмоль/(м² с) в течение 21 дня достоверно увеличила количество только 9,12-18:2 при достоверном уменьшении 14:0, 15:0, 18:0, 9-18:1 и 20:0 относительно контроля в липидах корней

Таблица 2. Состав и содержание этерифицированных жирных кислот липидов листьев и корней *O. basilicum* L., выращенных при разной интенсивности освещения, % от суммы МЭЖК

Жирные кислоты	Листья				Корни			
	контроль	50	100	150	контроль	50	100	150
		мкмоль/(м ² с)	мкмоль/(м ² с)	мкмоль/(м ² с)		мкмоль/(м ² с)	мкмоль/(м ² с)	мкмоль/(м ² с)
12:0	0.18 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.03 ^b	0.15 ± 0.04 ^B	0.16 ± 0.04 ^B	0.32 ± 0.08 ^A	0.19 ± 0.03 ^B
14:0	0.39 ± 0.10 ^b	0.59 ± 0.09 ^a	0.12 ± 0.04 ^c	0.14 ± 0.01 ^c	1.02 ± 0.11 ^A	1.28 ± 0.15 ^A	0.39 ± 0.01 ^B	0.38 ± 0.03 ^B
15:0	0.32 ± 0.08 ^a	0.39 ± 0.09 ^a	0.14 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.01 ^b	1.31 ± 0.06 ^A	0.91 ± 0.05 ^B	0.45 ± 0.01 ^C	0.49 ± 0.04 ^C
16:0	36.56 ± 2.61 ^a	32.93 ± 3.35 ^a	24.22 ± 2.19 ^b	18.37 ± 0.07 ^c	26.84 ± 4.81 ^A	27.24 ± 4.54 ^A	25.64 ± 0.56 ^A	28.54 ± 4.20 ^A
7-16:1	0.31 ± 0.02 ^b	0.37 ± 0.03 ^a	0.26 ± 0.03 ^c	0.31 ± 0.01 ^b	0.36 ± 0.14 ^A	0.32 ± 0.18 ^A	0.22 ± 0.06 ^A	0.36 ± 0.19 ^A
9-16:1	3.55 ± 0.61 ^a	3.19 ± 0.91 ^a	3.36 ± 0.72 ^a	3.23 ± 0.04 ^a	0.21 ± 0.07 ^A	0.19 ± 0.08 ^A	0.17 ± 0.02 ^A	0.24 ± 0.06 ^A
7,10-16:2	0.04 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.02 ^a	—	0.03 ± 0.01 ^a	—	—	—	—
10-17:1	0.04 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.03 ^a	—	—	—	—	—	0.06 ± 0.03
18:0	4.72 ± 0.63 ^a	3.92 ± 0.79 ^a	3.29 ± 0.28 ^a	2.66 ± 0.05 ^b	9.88 ± 2.46 ^B	10.58 ± 2.74 ^A	6.74 ± 1.34 ^{BC}	5.05 ± 1.35 ^C
7-18:1	0.45 ± 0.10 ^a	0.35 ± 0.10 ^a	—	—	—	—	—	—
9-18:1	4.35 ± 0.42 ^a	3.35 ± 0.67 ^a	3.53 ± 0.47 ^a	4.08 ± 0.78 ^a	8.29 ± 1.83 ^A	7.59 ± 1.48 ^A	7.96 ± 0.27 ^A	5.48 ± 0.59 ^B
11-18:1	1.43 ± 0.41 ^a	1.23 ± 0.60 ^a	—	—	5.28 ± 1.06 ^A	4.05 ± 0.26 ^A	—	—
9,12-18:2	12.02 ± 1.86 ^a	11.92 ± 2.46 ^a	13.22 ± 0.43 ^a	13.54 ± 0.16 ^a	21.02 ± 4.19 ^B	20.22 ± 3.61 ^B	36.52 ± 4.64 ^A	33.28 ± 3.19 ^A
9,12,15-18:3	34.68 ± 2.83 ^b	39.92 ± 3.92 ^b	51.44 ± 2.86 ^a	56.21 ± 3.39 ^a	21.64 ± 3.77 ^A	22.49 ± 2.81 ^A	17.95 ± 2.37 ^A	23.37 ± 2.41 ^A
19:0	—	—	—	—	0.70 ± 0.25 ^A	0.67 ± 0.38 ^{AB}	0.38 ± 0.11 ^B	—
20:0	0.93 ± 0.45 ^c	1.53 ± 0.35 ^a	0.25 ± 0.15 ^d	1.12 ± 0.05 ^b	2.97 ± 0.48 ^{AB}	3.83 ± 0.57 ^A	2.30 ± 0.21 ^B	1.58 ± 0.13 ^C
11-20:1	—	—	—	—	0.09 ± 0.03 ^A	0.10 ± 0.06 ^A	0.10 ± 0.05 ^A	0.15 ± 0.08 ^A
11,14-20:2	0.03 ± 0.02 ^b	0.03 ± 0.02 ^b	0.04 ± 0.03 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^a	—	—	—	—
21:0	—	—	—	—	0.07 ± 0.01 ^A	0.10 ± 0.02 ^A	0.07 ± 0.02 ^A	0.08 ± 0.03 ^A
22:0	—	—	—	—	0.10 ± 0.02 ^B	0.17 ± 0.04 ^A	0.11 ± 0.04 ^{AB}	0.09 ± 0.02 ^B
23:0	—	—	—	—	0.02 ± 0.01 ^A	0.03 ± 0.01 ^A	0.03 ± 0.02 ^A	0.04 ± 0.01 ^A
24:0	—	—	—	—	0.05 ± 0.02 ^A	0.07 ± 0.02 ^A	0.65 ± 0.04 ^A	0.62 ± 0.21 ^A
ΣЖКОДЦ	0.96 ± 0.10 ^b	1.55 ± 0.25 ^a	0.29 ± 0.35 ^c	1.19 ± 0.12 ^b	3.30 ± 0.29 ^B	4.36 ± 0.41 ^A	3.29 ± 0.32 ^B	2.56 ± 0.38 ^C

Примечание. Разными буквами указаны достоверно отличающиеся величины при $P < 0.05$.

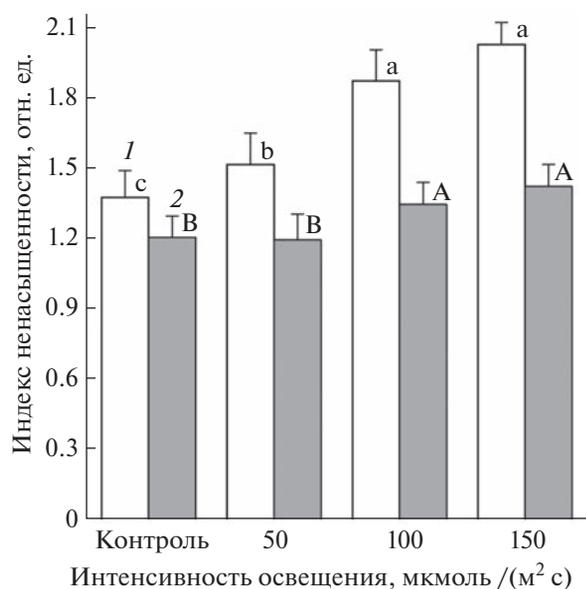


Рис. 3. Индекс ненасыщенности суммарных липидов листьев (1) и корней (2) *O. basilicum* L., выращенного при разной интенсивности освещения. Разными латинскими буквами отмечены достоверные отличия при $P < 0.05$.

O. basilicum. Из вышесказанного видно, что рост *O. basilicum* при различной интенсивности освещения несущественно изменил количественные соотношения между ЖК липидов корней, затронув, в основном, минорные НЖК, а наибольшие изменения зарегистрированы у МЖК и ПЖК (рис. 2б).

Изменения в качественном и количественном составе ЖК наглядно демонстрируют интегральный показатель – индекс ненасыщенности (ИН) (рис. 3). Так, ИН липидов листьев *O. basilicum* был достоверно выше при интенсивности освещения 100 и 150 мкмоль/(м² с), чем при интенсивности освещения 50 мкмоль/(м² с) (рис. 3). Похожую тенденцию можно увидеть и у ИН липидов корней *O. basilicum*.

Активность десатураз в корнях и листьях *O. basilicum*. Потребность в адаптации растения к повышенным уровням инсоляции вызывает изменение состояния клеточных мембран, благодаря чему клетки листьев поддерживают необходимые параметры текучести своих мембран. Изменение степени ненасыщенности происходит за счет участия ферментов. Исследовано изменение активности ω-3, ω-6 и ω-9-десатураз, которые осуществляют реакции десатурации ЖК в положениях 3, 6 и 9, соответственно. Об их интенсивности можно судить по коэффициентам стеароил-десатуразного (СДО), олеоил-десатуразного (ОДО) и линолеил-десатуразного (ЛДО) отношений (табл. 3). Значения ОДО более высокие, чем СДО, и в целом имеет близкие величины как для листьев, так и для корней *O. basilicum*. Сравнение значений ОДО и ЛДО в листьях показывает, что ω-6-ацил-липидная десатураза катализирует введение второй двойной связи в 9-18:1 интенсивнее, чем ω-3-ациллипидная десатураза – введение третьей двойной связи в 9,12,15-18:3 (табл. 3). Причем, увеличение интенсивности света приводит к достоверному увеличению значений СДО и ЛДО, что позволяет свидетельствовать в пользу светозависимой активации десатураз (табл. 3). Для корней *O. basilicum* максимальные значения ЛДО обнаружены при освещенности 50 мкмоль/(м² с), активность остальных десатураз в зависимости от интенсивности освещения меняется аналогично их активности в листьях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокое содержание биологически активных соединений большинства пряно-ароматических растений, в том числе и базилика, определило их значение не только как источник вкусовых добавок, но и как лечебно-физиологических активаторов, действующих на гормональном уровне регуляции нервной и пищеварительной системы человека. В культуре возделывается несколько видов

Таблица 3. Зависимость активности десатураз (по показателям СДО, ОДО и ЛДО) *O. basilicum* L., выращенного при различной интенсивности освещения

Десатуразное отношение	Листья				Корни			
	контроль	50 мкмоль/(м ² с)	100 мкмоль/(м ² с)	150 мкмоль/(м ² с)	контроль	50 мкмоль/(м ² с)	100 мкмоль/(м ² с)	150 мкмоль/(м ² с)
СДО	0.48 ± 0.03 ^{bc}	0.46 ± 0.02 ^c	0.52 ± 0.02 ^b	0.61 ± 0.03 ^a	0.46 ± 0.02 ^B	0.42 ± 0.02 ^C	0.54 ± 0.02 ^A	0.52 ± 0.01 ^A
ОДО	0.92 ± 0.04 ^a	0.94 ± 0.04 ^a	0.95 ± 0.04 ^a	0.95 ± 0.04 ^a	0.84 ± 0.03 ^B	0.85 ± 0.04 ^B	0.87 ± 0.03 ^{AB}	0.91 ± 0.03 ^A
ЛДО	0.74 ± 0.03 ^b	0.77 ± 0.02 ^{ab}	0.80 ± 0.03 ^{ab}	0.81 ± 0.03 ^a	0.51 ± 0.02 ^A	0.53 ± 0.03 ^A	0.33 ± 0.01 ^C	0.41 ± 0.02 ^B

Примечание. Разными буквами указаны достоверно отличающиеся величины при $P < 0.05$.

базилика (*Ocimum L.*) среди которых наибольшее распространение получил базилик обыкновенный (*O. basilicum*). Базилик любит солнечные теплые участки, поэтому для круглогодичного получения стабильного урожая в нашем климате эту зеленую овощную культуру выращивают, в основном, в закрытом грунте. Повышение эффективности производства этой светолюбивой культуры во многом связано с внедрением прогрессивных технологий, предусматривающих, в частности, оптимизацию светового режима. Высокая биологическая и энергетическая эффективность источников искусственного света в конечном счете определяют экономический эффект светокультуры растений и возможность более широкого ее использования в тепличных хозяйствах [17]. Кроме того, будучи быстрорастущим и обладая высокой экологической пластичностью, *O. basilicum* является удобным модельным объектом для изучения физиолого-биохимических механизмов ответа на воздействия физических факторов среды.

При определении биологической эффективности источника искусственного света в качестве основных критериев оценки берется показатель интенсивности фотосинтеза и скорости роста — основные физиологические процессы, определяющие продуктивность растений. Фотосинтез и рост — два основных процесса жизнедеятельности растений, от сбалансированности которых зависит конечный урожай растений. Очень важным представляется установление верхнего предела интенсивностей света, обеспечивающего наиболее благоприятное протекание физиологических процессов. В адаптации растений к кратковременным и длительным изменениям инсоляции участвуют разные механизмы. Продолжительное действие слабого или интенсивного света приводит к формированию новых фотосинтезирующих структур, влияет на анатомо-морфологические показатели листа, содержание и состав пигментов, количество хлорофиллов и светособирающих пигмент-белковых комплексов. Свет высокой интенсивности является основным стрессовым фактором, который отрицательно влияет на функцию фотосинтетического аппарата. В условиях светового стресса, когда чрезмерно поглощенная световая энергия не может быть использована в фотохимических реакциях, возникает фотоингибирование, сопровождающееся снижением интенсивности фотосинтеза, образованием активных форм кислорода (АФК), фотоокислением пигментов и разрушением структуры хлоропластов [18]. Если интенсивность света слишком высока, это приводит к повышенному содержанию АФК, которое, помимо повреждающего действия, может выполнять и сигнальную функцию, запуская механизмы регуляции обменных процессов [5].

В нашей работе, прежде всего, важно было проследить связь различных режимов освещенности с

изменениями содержания биомассы, сухого вещества фотосинтетических показателей *O. basilicum*, а также со стресс-устойчивостью растений (содержание МДА) при длительном выращивании на люминесцентном свете (табл. 1). *O. basilicum*, выросший при интенсивностях 50, 100 и 150 мкмоль/(м²с), имел прирост биомассы листьев и корней в 4–6 и в 4–7 раз, соответственно, по сравнению с контрольными. Полученные данные хорошо согласуются с литературными, где показан прирост биомассы за аналогичное время в среднем в 4–11 раз [5]. Растения постоянно адаптируют свой рост и физиологию к вариативным условиям окружающей среды [19]. Свет модулирует рост растений и адаптацию к физическим воздействиям среды на протяжении всего его развития [20]. Улучшение светового режима повышало накопление биомассы и пищевую ценность многих зеленых растений [21, 22]. Незначительные достоверные изменения в содержании сухого вещества в листьях и корнях *O. basilicum* позволяют говорить об отсутствии физиологически значимого обезвоживания, т.е. условия эксперимента не являлись стрессовыми (табл. 1), и растения прекрасно откликнулись на выбранные дозировки интенсивности света, показывая хорошие результаты в росте и наборе массы.

Показатели, отражающие содержание фотосинтетических пигментов, являются важными индикаторами физиологического состояния растений [2]. В листьях базилика наблюдали светозависимое повышение содержания хлорофиллов (*a*, *b*), что указывало на интенсификацию процессов фотосинтеза в растениях [21, 23]. Содержание хлорофилла *a* в листьях не только значительно превосходило содержание хлорофилла *b*, но и отличалось более высокой интенсивностью накопления в зависимости от интенсивности освещения (рис. 1). Соотношение хлорофиллов *a* и *b* и доля хлорофиллов, участвующих в светосборе, — функционально взаимосвязанные величины, и поэтому они изменяются в более узких пределах, чем их общее содержание. Накопление хлорофилла обычно происходит вследствие повышения его концентрации на фоне уменьшения числа пластид и увеличения их размеров [24]. Рост величины *a/b* в эксперименте (табл. 1) может свидетельствовать в пользу приближения ассимиляции CO₂ по типу C₄ [22]. Фотодыхание в типе C₄ почти компенсировано, и такие растения значительно эффективнее фиксируют CO₂, следовательно, возможность производства сухой биомассы увеличивается в 2.5–6 раз по сравнению с растениями C₃-типа [25]. Увеличение общего количества хлорофиллов (рис. 1) указывает на повышение фотосинтетической продуктивности при незначительном окислительном стрессе. На основании полученных результатов можно говорить об отсутствии

негативного влияния данных излучений, исключая стрессорное воздействие на растения. Таким образом, выявлены закономерности формирования продуктивности *O. basilicum* в условиях различной интенсивности облучения. Исследование структурно-функциональных показателей фотосинтетического аппарата и ростовых процессов в зависимости от условий освещения показало, что повышение интенсивности света в изучаемых пределах приводит к большему накоплению биомассы.

Растения нередко испытывают стресс в результате избыточного поглощения световой энергии. В большинстве случаев это вызывало усиление образования АФК. Одним из неблагоприятных последствий перекисного окисления липидов считается образование МДА в результате обусловленного свободными радикалами разрыва ПЖК. Являясь токсичным соединением, МДА способен взаимодействовать со свободными аминокеттогруппами белков и фосфолипидов, что приводит к нарушению работы клеточных мембран, и по накоплению МДА можно судить об устойчивости растений к внешним воздействиям [26]. Содержание МДА — удобный модулятор окислительного стресса, который позволяет проверить адаптационный потенциал растений в лабораторных условиях. Одной из главных мишеней АФК является фотосинтетический аппарат растений, в том числе и молекулы хлорофилла. Другой мишенью для АФК служат мембранные липиды, в результате перекисного окисления которых образуется МДА. Измерение содержания МДА в листьях растений считается одним из критериев развития окислительного стресса при действии различных стресс-факторов [27]. Повышение интенсивности освещения до 150 мкмоль/(м² с) хоть и приводило к некоторому увеличению содержания МДА в листьях опытных растений до ≈24 нмоль/г сырой массы, однако, эти значения не являются стрессовыми для базилика [5]. Если оценивать количество МДА относительно доли ПЖК в суммарных липидах листьев при разных режимах освещенности (табл. 1, рис. 2а), то имеет место нивелирование этого увеличения. Относительно стабильное содержание МДА указывает на высокую адаптационную способность растений в эксперименте. Можем заключить, что для накопления биомассы и фотосинтезирующих пигментов растениями *O. basilicum* в условиях эксперимента режим освещенности 150 мкмоль/(м² с) был наиболее благоприятным.

В целом, ЖК-состав липидов базилика изучен недостаточно. Наиболее подробно исследованы семена, содержащие в качестве главных ЖК 16:0, 18:0, 9-18:1, 9,12-18:2 и 9,12,15-18. Кроме того, в семенах в содержании менее 1% обнаружены 14:0, 9-16:1, 20:0, 22:0 и др. [8, 28, 29]. ЖК семян растений

входят в состав нейтральных триацилглицеринов, в то время как липиды вегетативных частей представлены, в основном, полярными составляющими — фосфо-, глико- и галактолипидами, входящими в состав мембран клеток и клеточных компартментов.

Устойчивость растений к действию разнообразных факторов среды обуславливается структурно-функциональной перестройкой клеток, связанной с изменениями на молекулярном уровне в зависимости от генотипа растений. Считается, что липиды клеточных мембран играют ключевую роль в процессах адаптации и формировании устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды. Эта устойчивость коррелирует с наличием в клеточных мембранах ПЖК. Для ответа на вопрос о том, в какой мере фотоиндуцированная перестройка имеет место быть, мы обратились к анализу последствий действия света и исследовали состав ЖК липидов листьев и корней базилика одновременно с динамикой образования водорастворимых продуктов перекисного окисления ПЖК. Несмотря на устоявшееся мнение об участии липидов в формировании адаптивных реакций растений к действию различных факторов среды [30], влияние изменений уровней инсоляции на липиды листьев и корней исследованы явно недостаточно. Адаптивные изменения ЖК-состава мембранных липидов под действием внешних факторов известны давно и интенсивно изучаются [31, 32], однако вопрос о молекулярных механизмах этого процесса до последнего времени остается открытым. Существуют несколько гипотез, объясняющих накопление ПЖК. Так, считается, что воздействие внешних факторов может вызывать повышение активности пресинтезированных десатураз [32]. Альтернативная схема предполагает, что при этом может замедляться синтез насыщенных ЖК *de novo*, в то же время активность десатураз остается без изменений, в результате чего соотношение НЖК и ПЖК смещается в сторону последних [33]. В этих моделях ведущая роль в запуске адаптационных механизмов отводится мембранам и их физиологическому состоянию, выраженному вязкостью или текучестью, зависящих от степени ненасыщенности ЖК в мембранных липидах. Образование ПЖК меняет конфигурацию липидов, в результате мембраны восстанавливают свою текучесть. Рассматривая текучесть мембран в качестве основного параметра, позволяющего клеткам адекватно воспринимать сигналы об изменении параметров окружающей среды, можно констатировать существование сенсоров, реагирующих на изменение физиологического состояния мембран независимо от природы стрессового сигнала.

Обнаруженная нами тенденция увеличения доли ненасыщенных ЖК в суммарных липидах листьев и корней *O. basilicum* при повышении уровней инсоляции выращивания согласуется с

основными положениями теории адаптации растений к воздействию различных факторов среды. Важнейшим фактором адаптации растительных клеток к различной интенсивности освещения является регуляция процессов ферментативной десатурации липофильных соединений. Благодаря регулированию скорости десатурации ЖК, входящих в состав фосфолипидов в клеточных мембранах, происходит сдвиг ее вязкости, т.к. именно ЖК относятся к самым быстро обновляемым компонентам молекул мембранных фосфолипидов. При действии внешних факторов могут происходить перегруппировки различных групп ЖК: изменяется степень их ненасыщенности, длина цепи, позиционное расположение двойных связей, количество полярных групп [34]. Ключевым звеном адаптации растений является защита мембран от физических факторов среды, включающая изменения их липидного и ЖК-состава. Поддержание вязкости мембран обусловлено изменениями степени ненасыщенности мембранных липидов вследствие реакций, необходимых для поддержания их физических свойств [30, 31, 35]. Судя по составу ЖК липидов *O. basilicum*, существенно поменялся вклад ЖК в поддержание вязкости мембран, ответственных за общую ненасыщенность липидов, особенно за счет ПЖК (рис. 2, 3). Что касается МЖК, то, по нашим данным, не прослеживается зависимости их содержания от интенсивности света в процессе роста, особенно для листьев (рис. 2а). В корнях наблюдается некоторое снижение количества МЖК при усилении интенсивности света до 100 и 150 мкмоль/(м² с).

Необходимо отметить также изменения в группе ЖК с числом атомов углерода ≥ 20 , именуемых ЖК с очень длинной цепью (ЖКОДЦ). Так, в липидах листьев и корней *O. basilicum*, Σ ЖКОДЦ была достоверно максимальной при выращивании с интенсивностью освещения 50 мкмоль/(м² с), при этом наблюдался рост насыщенных компонентов (табл. 2). Интенсивность освещения 150 мкмоль/(м² с) не приводила к достоверному изменению в Σ ЖКОДЦ липидов листьев *O. basilicum* относительно контроля, при этом наблюдался достоверной рост доли ненасыщенных ЖК в них. В липидах корней *O. basilicum* Σ ЖКОДЦ достоверно уменьшалась с увеличением интенсивности освещения только за счет насыщенных ЖК. Известно, что ЖКОДЦ присутствуют на фосфатидилинозитолфосфатах в виде ацильных фрагментов и обладают отличительными биофизическими свойствами в виде повышения липидной гидрофобности и перехода из жидкой фазы в гелевую [36]. Можно полагать, что контроль за (не-)насыщенностью ЖК является механизмом, включающимся в комплекс процессов, связанных с адаптацией фотосинтезирующего аппарата к инсоляции. Кроме того, ЖКОДЦ приписывают функции регуляции дифференцировки и ограничения роста клеток

путем включения их в состав мембранных липидов [37]. ЖКОДЦ и их производные могут контролировать рост органов, ограничивая пролиферацию клеток и, таким образом, размеры органов растений: синтез ЖКОДЦ в эпидермисе необходим для надлежащего контроля пролиферации клеток у *Arabidopsis thaliana* с участием цитокининов [38]; они также могут участвовать в поддержании транспорта полярных ауксинов во время формирования паттерна тканей во время развития растений [39].

Суммируя литературные и полученные нами данные, можно заключить, что *O. basilicum* сравнительно легко приспосабливается к изменению интенсивности света благодаря адаптивным перестройкам в мембранах клеток [40]. Наряду с другими параметрами, состав ЖК липидов мембран также зависит от освещения. Изучая вопрос о механизме процесса адаптации как одну из реакций приспособления к новым условиям можно предположить, что происходит перестройка ЖК-состава, состоящая в том, что путем десатурации образуются липиды, обогащенные ПЖК. Это приводит к формированию структуры фотосинтетического аппарата, обеспечивающей активное его функционирование в новых условиях. Таким образом, изменения соотношения ЖК суммарных липидов вегетативных органов *O. basilicum* являются важной составляющей фотоиндуцированных адаптивных перестроек мембран. *O. basilicum* обладает хорошими возможностями для адаптации к повышению уровней освещенности на биохимическом уровне, изменяя текучесть мембран и мембранных компартментов, участвующих в механизмах реализации устойчивости растений к различным факторам внешней среды. Можно заключить, что *O. basilicum* успешно адаптируется, выбирая приспособительную стратегию изменения количественного ЖК-состава суммарных липидов в ответ на увеличение интенсивности освещения. Формирование фотоиндуцированного механизма адаптации растений базилика может быть непосредственно связано с изменениями в молекулярной структуре ЖК клеточных мембран и модуляцией активности десатураз.

ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что интенсивность освещения влияет на морфометрические, физиологические и биохимические характеристики вегетативных органов – листьев и корней – *O. basilicum*. Были выявлены закономерности изменений ЖК-состава мембранных липидов и формирования продуктивности у растений базилика в процессе приспособляемости к условиям различной интенсивности облучения. Можно заключить, что максимальные показатели продуктивного роста и реализация

адаптационных механизмов зеленых и подземных частей растений базилика соответствуют освещению 150 мкмоль/(м² с). Степень повреждения *O. basilicum* при действии данного фактора, определяемая по содержанию МДА, незначительна. Повышение ИН ЖК мембранных липидов можно считать одним из признаков успешной адаптации к повышенным интенсивностям освещенности. Таким образом, в результате проведенного исследования, нами выявлены закономерности модификации пула ЖК в суммарных липидах при адаптации к различным режимам освещения.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9). Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Стеценко Ларисе Алексеевне за участие в выполнении работы на всех этапах.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Keyser E., Dhooghe E., Christiaens A., Van Labeke M.-C., Huylenbroeck J.V. LED light quality intensifies leaf pigmentation in ornamental pot plants // *Sci. Hortic.* 2019. V. 253. P. 270. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.006>
2. Pashkovskiy P., Vereshchagin M., Kreslavski V., Ivanov Y., Kumachova T., Ryabchenko A., Voronkov A., Kosobryukhov A., Kuznetsov V., Allakhverdiev S.I. Effect of phytochrome deficiency on photosynthesis, light-related genes expression and flavonoid accumulation in *Solanum lycopersicum* under red and blue light // *Cells.* 2022. V. 11. P. 3437. <https://doi.org/10.3390/cells11213437>
3. Lobiuc A., Vasilache V., Oroian M., Stoleru T., Burducea M., Pintilie O., Zamfirache M.M. Blue and red LED illumination improves growth and bioactive compounds contents in acyanic and cyanic *Ocimum basilicum* L. microgreens // *Molecules.* 2017. V. 22. P. 2111. <https://doi.org/10.3390/molecules22122111>
4. Kreslavski V.D., Los D.A., Schmitt F.J., Zharmukhamedov S.K., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. The impact of the phytochromes on photosynthetic processes // *BBA-Bioenerg.* 2018. V. 1859. P. 400. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.03.003>
5. Stetsenko L.A., Pashkovskiy P.P., Voloshin R.A., Kreslavski V.D., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. Role of anthocyanin and carotenoids in the adaptation of the photosynthetic apparatus of purple- and green-leaved cultivars of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to high-intensity light // *Photosynthetic.* 2020. V. 58. P. 890. <https://doi.org/10.32615/ps.2020.048>
6. Voronkov A.S., Ivanova T.V., Kumachova T.K., Kozhevnikova A.D., Tsydendambaev V.D. Polyunsaturated and very-long-chain fatty acids are involved in the adaptation of maloideae (Rosaceae) to combined stress in the mountains // *Chem. Biodivers.* 2020. V. 17. e1900588. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900588>
7. Fernandes F., Pereira E., Cirić A., Soković M., Calhella R.C., Barros L., Ferreira I.C. *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* leaves (red rubin basil): a source of bioactive compounds and natural pigments for the food industry // *Food Funct.* 2019. V. 10. P. 3161. <https://doi.org/10.1039/C9FO00578A>
8. Idris A.A., Nour A.H., Ali M.M., Erwa I.Y., Ishag O.A.O., Nour A.H. Physicochemical properties and fatty acid composition of *Ocimum basilicum* L. seed oil // *AJPSCS.* 2020. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.9734/ajopacs/2020/v8i130104>
9. Mostafavi S., Asadi-Gharneh H.A., Miransari M. The phytochemical variability of fatty acids in basil seeds (*Ocimum basilicum* L.) affected by genotype and geographical differences // *Food Chem.* 2019. V. 276. P. 700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.027>
10. Hoagland D.R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil. // *Soil Sci.* 1950. V. 48. P. 4.
11. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes // *Method. Enzymol.* 1987. V. 148. P. 350.
12. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. V. 125. P. 189.
13. Voronkov A.S., Ivanova T.V., Kumachova T.K. The features of the fatty acid composition of *Pyrus* L. total lipids are determined by mountain ecosystem conditions // *Plant Physiol. Bioch.* 2022. V. 170. P. 350. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.021>
14. Ivanova T.V., Voronkov A.S., Kumachova T.K.H., Tsydendambaev V.D. Distinguishing features of fatty acid content and composition in total lipids of *Malus orientalis* Uglitzk. pericarp // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 463. <https://doi.org/10.1134/S1021443720030127>
15. Voronkov A., Ivanova T. Significance of lipid fatty acid composition for resistance to winter conditions in *Asplenium scolopendrium* // *Biology.* 2022. V. 11. P. 507. <https://doi.org/10.3390/biology11040507>
16. Voronkov A.S., Ivanova T.V., Kuznetsova E.I., Kumachova T.Kh. Adaptations of *Malus domestica* Borkh. (Rosaceae) fruits grown at different altitudes // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 922. <https://doi.org/10.1134/S1021443719060153>
17. Xin P., Li B., Zhang H., Hu J. Optimization and control of the light environment for greenhouse crop production // *Scientific Rep.* 2019 V. 9. P. 8650. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44980-z>
18. Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Moharty P. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis // *Photosynth. Res.* 2008. V. 98. P. 541. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9331-0>
19. Mareri L., Parrotta L., Cai G. Environmental Stress and Plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 5416. <https://doi.org/10.3390/ijms23105416>

20. Galvão V., Fankhauser C. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2015. P. 46. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.013>
21. Carvalho S.D., Schwieterman M.L., Abraham C.E., Colquhoun T.A., Folta K.M. Light quality dependent changes in morphology, antioxidant capacity, and volatile production in sweet basil (*Ocimum basilicum*) // *Front. Plant Sci.* 2016. V.7. P. 1328. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01328>
22. Зотов В.С., Большевичева Ю.В., Ханчаева С.А., Терехова И.В., Шубин В.В., Юрина Н.П., Кульчин Ю.Н. Влияние спектрального состава освещения на выход биомассы, флуоресценцию хлорофилла фотосистемы 2 и общее содержание эфирных масел у *Ocimum basilicum* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2020. Т. 56. С. 283. <https://doi.org/10.31857/S0555109920030174>
23. Kosobryukhov A.A., Kreslavski V.D., Khramov R.N., Brakkova L.R., Shchelokov R.N. Effect of additional low intensity luminescence radiation 625 nm on plant growth and photosynthesis // *Biotronics.* 2000. V. 29. P. 23.
24. Feng L., Raza M.A., Li Z., Chen Y., Khalid M.H.B., Du J., Liu W., Wu X., Song C., Yu L., Zhang Z., Yuan S., Yang W., Yang F. The influence of light intensity and leaf movement on photosynthesis characteristics and carbon balance of soybean // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 9. P. 1952. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01952>
25. Турманидзе Н.М., Дolidзе К.Г. Результаты изучения динамики содержания пластидных пигментов в листьях чайного растения // *Фундаментальные исследования.* 2014. Т. 9. С. 2009.
26. Liang X., Qian R., Wang D., Liu L., Sun C., Lin X. Lipid-derived aldehydes: new key mediators of plant growth and stress responses // *Biology.* 2022. V. 11. P. 1590. <https://doi.org/10.3390/biology11111590>
27. Kurganova L.N., Veselov A.P., Goncharova T.A., Sinitsyna Yu.V. Lipid peroxidation and antioxidant systems of protection against heat shock in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts // *Russ. J. Plant Physiol.* 1997. V. 44. P. 630.
28. Angers P., Morales M.R., Simou J.E. Fatty acid variation in seed oil among *Ocimum* species // *JAOCS.* 1996. V. 73. P. 393.
29. Malik M.S., Sattar A., Khan S.A. The fatty acids of indigenous resources from possible industrial applications. part xvii: the fatty acid composition of the fixed seed oils of *Ocimum basilicum* and *Ocimum album* seeds // *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 1989. V.32. P. 207.
30. Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: ФЭН. 2001. 448 с.
31. Los D., Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases // *Biochem. Biophys. Acta.* 1998. V. 1394. P. 3.
32. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир, 2014. 373 с.
33. Farkas T. Adaptation of fatty acid composition to temperature – a study on carp (*Cyprinu scarpio* L.) livir slices // *Comp. Biochem. Physiol.* 1984. V. 79. P. 531.
34. Millar A.A., Smith M.A., Kunst L. All fatty acid and not equal: discrimination in plant membrane lipids // *Trends Plant Sci. Rev.* 2000. V. 5. P. 95. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01566-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01566-1)
35. Ntambi J.M. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acid and cholesterol // *J. Lipid Res.* 1999. V. 40. P. 1549.
36. Paz Ramos A., Lague P., Lamoureux G., Lafleur M. Effect of saturated very long-chain fatty acids on the organization of lipid membranes: a study combining 2H NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations // *J. Phys. Chem. B.* 2016. V. 120. P. 6951. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b04958>
37. Bach L., Gissot L., Marion J., Tellier F., Moreau P., Satiat-Jeunemaitre B., Palauqui J.-C., Napier J.A., Faure J.-D. Very-long-chain fatty acids are required for cell plate formation during cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* // *J. Cell Sci.* 2011. V. 124. P. 3223. <https://doi.org/10.1242/jcs.074575>
38. Nobusawa T., Okushima Y., Nagata N., Kojima M., Sakakibara H., Umeda M. Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation // *PLoS Biol.* 2013. V. 11. e1001531. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001531>
39. Roudier F., Gissot L., Beaudoin F., Haslam R., Michaelson L., Marion J., Molino D., Lima A., Bach L., Morin H., Tellier F., Palauqui J.-C., Bellec Y., Renne C. et al. Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2010. V. 22. P. 364. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071209>
40. Tarchoune I., Baatour O., Harrathi J., Hamdaoui G., Lachaa M., Ouerghi Z., Marzouk B. Effect of two sodium salts on fatty acid and essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) // *Acta Physiol. Plant.* 2013. V. 35. P. 2365. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1271-4>

УДК 581.1

КРАТКОВРЕМЕННАЯ ПРЕДОБРАБОТКА МЕЛАТОНИНОМ ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ К ПОСЛЕДУЮЩЕМУ ДЕЙСТВИЮ КАДМИЯ

© 2023 г. Е. Д. Данилова^{а, *}, И. Е. Злобин^{а, b}, М. В. Ефимова^а

^а Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Национальный исследовательский Томский государственный университет”, Томск, Россия

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

*e-mail: nusyl.d@gmail.com

Поступила в редакцию 04.03.23 г.

После доработки 04.03.2023 г.

Принята к публикации 04.03.2023 г.

Исследовано влияние кратковременной и длительной прикорневой обработки мелатонином на ростовые параметры, фотохимическую активность ФС II, содержание основных фотосинтетических пигментов, перекисное окисление липидов и накопление неорганических ионов в растениях ячменя на фоне действия хлорида кадмия. Впервые показано, что защитное действие фитомелатонина при кратковременной обработке проявляется в снижении токсического действия кадмия на содержание фотосинтетических пигментов и накопление ионов кадмия в побегах и корнях растений ячменя. В основе протекторного действия мелатонина лежит его способность снижать интенсивность окислительного стресса за счет поддержания уровня каротиноидов и повышения активности антиоксидантных ферментов. Эффективность кратковременного применения мелатонина по ряду показателей превосходит его защитный эффект от длительного воздействия. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения мелатонина в качестве вещества, индуцирующего состояние прайминга растений при последующем действии кадмия.

Ключевые слова: мелатонин, кадмий, *Hordeum vulgare*, прайминг, тяжелые металлы, неорганические ионы, фотосинтез

DOI: 10.31857/S0015330323600225, **EDN:** WWXHRG

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение почв ионами тяжелых металлов (ТМ) обусловлено использованием фосфатных удобрений, добычей полезных ископаемых, сжиганием топлива и металлургическими промышленными процессами [1, 2]. Избыточные концентрации ТМ в среде вызывают снижение продуктивности растений и создают риски для животных и человека из-за загрязнения продуктов питания и кормов токсичными элементами. Повышенное содержание подвижных форм ТМ присуще кислым почвам, на которые приходится более трети всех пахотных угодий [2, 3]. Одним из наиболее токсичных металлов является кадмий, избыточная концентрация которого лимитирует рост и развитие растений [4, 5]. Наиболее интенсивные источники загрязнения окружающей среды кадмием –

металлургия и гальванотехника, а также сжигание твердого и жидкого топлива. Кадмий токсичен даже в низких концентрациях [6]. Он негативно влияет на растения на морфологическом, физиологическом, биохимическом и молекулярном уровнях [7]. Многочисленные исследования показали, что кадмий ингибирует прорастание семян, уменьшает длину и массу корней, снижает число листьев растений [8]. Наравне со свинцом и медью, кадмий является одним из наиболее токсичных металлов, попадающих в пищевые цепи и способных вызывать у человека канцерогенные и хронические заболевания. Кислотность почв повышает доступность ионов ТМ, в том числе и кадмия для растений. Однако, принятые в настоящее время технологии снижения кислотности почв могут оказывать негативное влияние на окружающую среду [9]. Применение соединений гормональной природы для повышения продуктивности растений в условиях техногенного стресса является эффективной и безопасной технологией [3]. В этом свете особый интерес представляет фитоме-

Сокращения: ПО – пероксидаза; СОД – супероксиддисмутаза; ТБК-АП – соединения, активные в реакции с тио-барбитуровой кислотой при нагревании; ТМ – тяжелые металлы

Таблица 1. Схема эксперимента

№	Варианты	1–5 сут (5 сут)	5–12 сут (7 сут)	12–13 сут (1 сут)	13–19 сут (6 сут)
1	Контроль	Проращивание семян в перлите	Адаптация к условиям жидкой питательной среды по Blamey (ПС, pH 4.5)	ПС	ПС
2	Кратковременное воздействие мелатонином			ПС + 10 мкМ Мел	ПС
3	Длительное воздействие мелатонином			ПС	ПС + 10 мкМ Мел
4	Кадмий			ПС	ПС + 2 мкМ CdCl ₂
5	Прайминг мелатонином + кадмий			ПС + 10 мкМ Мел	ПС + 2 мкМ CdCl ₂
6	Длительное воздействие мелатонина и кадмия			ПС	ПС + 10 мкМ Мел + 2 мкМ CdCl ₂

латонин — плейотропная молекула индольной природы, которую ряд исследователей относят к фитогормонам [10]. Показано, что экзогенный мелатонин снижает токсическое действие меди, кадмия, алюминия и никеля за счет усиления роста корней, повышения антиоксидантной активности, увеличения интенсивности фотосинтеза и снижения накопления ионов металлов в разных частях растений [11–13]. Однако, в большинстве работ, посвященных влиянию мелатонина на устойчивость растений в условиях избытка ТМ, используют высокие концентрации как самого мелатонина, так и изучаемых металлов. Первое является экономически не выгодным, второе не соответствует реальным характеристикам загрязненных почв. Кроме того, в научной литературе практически не обсуждается способность мелатонина вызывать у растений состояние прайминга — процесса приобретения организмом способности повышать стресс-толерантность в ответ на действие того или иного повреждающего фактора в будущем [14]. Мелатонин может служить индуктором прайминга, приводя к значительному повышению устойчивости растений к самым разным абиотическим и биотическим повреждающим воздействиям. Целесообразным представляется изучение краткосрочного, по сравнению длительным, воздействия мелатонина на устойчивость злаковых растений к действию тяжелых металлов в условиях прикорневой обработки. Данные о механизмах защиты растений мелатонином в ответ на действие ионов кадмия, а также оптимизация технологии обработки растений с целью получения максимального защитного эффекта имеют существенное значение как для получения новых фундаментальных знаний, так и для создания научной основы разработки инновационных сель-

скохозяйственных технологий повышения продуктивности растений.

Цель работы — выяснение физиологических механизмов прайминга мелатонином растений ячменя на фоне отсроченного действия избыточного содержания кадмия в среде по сравнению с длительным действием мелатонина во время “кадмиевого стресса”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на растениях ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Биом. Растения выращивали в грунте с добавлением перлита в течение пяти суток при температуре $19 \pm 2^\circ\text{C}$ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом. Далее, в течение семи суток, растения адаптировали к условиям жидкой питательной среды по Blamey (pH 4.5) [15] с низким содержанием фосфора. Данная питательная среда наиболее соответствует реальному составу почвенного раствора на кислых почвах по сравнению с традиционно используемыми питательными средами, где из-за высоких значений pH раствора и высоких концентраций фосфат-ионов доступность ионов металлов для растений и, следовательно, их токсический эффект значительно снижены [3, 16].

После адаптации часть растений подвергали суточной прикорневой обработке мелатонином в концентрации 10 мкМ. Для остальных растений меняли питательную среду на сутки. Затем все растения разделяли на шесть вариантов (табл. 1).

Концентрацию хлорида кадмия (CdCl₂) подбирали на основании типичных значений в почвенном растворе промышленно загрязненных кислых почв [16–18]. Через шесть суток оценива-

ли ростовые показатели (длину осевых органов, суммарную площадь листовой поверхности), содержание фотосинтетических пигментов и параметры фотохимической активности ФС II. Растительный материал для проведения биохимических методов анализа фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C .

Сырую и сухую биомассы растительного материала оценивали гравиметрическим методом с помощью аналитических весов “Sartorius CP 622” (Германия). Сухую массу определяли после фиксации материала и его высушивания до постоянного веса. Содержание воды (% от сырой массы) рассчитывали, исходя из отношения разности сырой и сухой биомасс, отнесенной к сырой массе. Расчет площади листьев осуществляли по формуле Аникеева и Кутузова [19].

Параметры фотохимической активности ФС II измеряли с помощью РАМ-флуориметра (MINI-РАМ-II, “Heinz-Walz”, Германия). Параметры коэффициентов флуоресценции и относительной скорости транспорта электронов рассчитывали с использованием программного обеспечения MINI-РАМ-II.

Анализ содержания металлов в корневой системе и надземной части растений производили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) (масс-спектрометр “Agilent 7900”, США). С целью десорбции ионов металлов из апопластного пространства использовали отмывку растворами хлорида кальция.

Величину ПОЛ измеряли спектрофотометрическим методом по концентрации соединений, активных в реакции с тиобарбитуровой кислотой при нагревании (ТБК-АП) по Buege и Aust [20].

Концентрацию фотосинтетических пигментов в растворе определяли согласно Lichtenthaler [21]. Навеску листьев (70 мг) вносили в пробирку с 96% этанолом (1.5 мл) и карбонатом кальция, вортиксировали, центрифугировали 10 мин (10000 g), надосадочную жидкость аккуратно переносили в пробирку. Данную экстракцию производили трижды, пробирки держали в темноте. Доводили количество спирта во всех пробирках до одинакового объема (до 5 мл), перемешивали и измеряли оптическую плотность.

Содержание эндогенного пролина определяли согласно Bates с соавт. [22].

Для оценки активности супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы (ПО) образцы растений растирали в жидком азоте с нерастворимым поливинилпирролидоном, экстрагировали калий-фосфатным буфером (рН 7.4), затем центрифугировали 20 мин (8000 g, $t = 4^{\circ}\text{C}$) (“Eppendorf 5430R”, Германия). Из полученного супернатанта отбирали аликвоты для определения активности СОД и ПО. Общую активность СОД определяли по методу, описанному Beauchamp и Fridovich [23]. Ак-

тивность ПО определяли согласно Шемяковой с соавт. [24]. Содержание белка в препаратах измеряли по методу Esen [25].

Полученные результаты представлены в таблицах и на рисунках в виде средней арифметической со стандартной ошибкой. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения t -критерия находили для 95% уровня значимости ($P \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние хлорида кадмия и мелатонина на морфометрические параметры растений ячменя

В оптимальных условиях выращивания мелатонин не оказывал достоверного влияния на рост ячменя. Добавление в раствор 2 мкМ кадмия вызывало подавление роста стебля и корня на 11 и 24%, соответственно (рис. 1а, 2). Мелатонин, вне зависимости от длительности воздействия, частично снижал негативное действие “кадмиевого стресса” на рост стебля и корня.

Негативное воздействие “кадмиевого стресса” отразилось не только на размерах осевых органов, но и на площади листовой поверхности, которая сокращалась на 12% (рис. 1б, 2). Прайминг мелатонином с последующим “кадмиевым стрессом”, как и длительное воздействие мелатонина, частично поддерживали площадь ассимилирующей поверхности по сравнению с действием кадмия в отсутствие мелатонина.

Влияние хлорида кадмия и мелатонина на фотосинтетические параметры растений ячменя

Анализ флуоресценции хлорофилла – широко распространённый метод для обнаружения изменений в условиях стресса не только ФС II, но и фотосинтетического аппарата в целом. Одним из основных критериев эффективности протекания фотохимических процессов в ФС II является максимальная квантовая эффективность (F_v/F_m). Полученные данные свидетельствуют о том, что F_v/F_m листьев растений снижалась на 6% при действии ионов кадмия относительно контрольного варианта (табл. 2).

Под действием 2 мкМ CdCl_2 фотохимическая эффективность ФС II несколько снижалась, о чем можно судить по тенденции к уменьшению параметра эффективного квантового выхода ФС II ($Y(II)$) и увеличению нерегулируемой диссипации энергии в ФС II ($Y(NO)$). Фотоповреждение ФС II является результатом превышения поглощения световой энергии фотосистемой над способностью использования энергии при фотосинтезе [26].

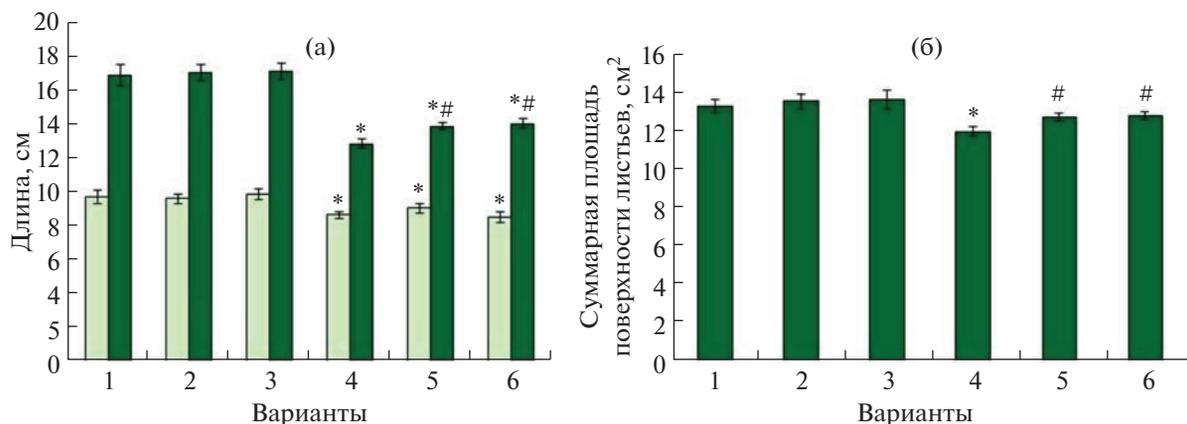


Рис. 1. Влияние хлорида кадмия и мелатонина на рост растений ячменя: а – длина стебля и корня; б – суммарная площадь листовой поверхности. * $P \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $P \leq 0.05$ при сравнении с CdCl_2 . 1 – контроль; 2 – мелатонин (1 сут); 3 – мелатонин (6 сут); 4 – CdCl_2 (6 сут); 5 – мелатонин (1 сут) + CdCl_2 (6 сут); 6 – мелатонин (6 сут) + CdCl_2 (6 сут).



Рис. 2. Внешний вид растений ячменя, выращенных в среде с добавлением хлорида кадмия и мелатонина: 1 – контроль; 2 – мелатонин (1 сут); 3 – мелатонин (6 сут); 4 – CdCl_2 (6 сут.); 5 – мелатонин (1 сут) + CdCl_2 (6 сут); 6 – мелатонин (6 сут) + CdCl_2 (6 сут).

ФС II у предварительно обработанных мелатонином растений сохраняла более высокую фотохимическую активность в условиях загрязнения хлоридом кадмия. Так, значение параметра эффективного квантового выхода ФС II ($Y(II)$) в варианте с праймингом было практически равно контрольному (табл. 2), как и при длительном воздействии мелатонином. Кроме того, длительная обработка мелатонином на фоне действия ионов кадмия снижала регулируемое тепловое рассеяние энергии возбуждения ($Y(NPQ)$) на

19%, а кратковременная – на 23% по сравнению со стрессовым вариантом.

Другим негативным эффектом ТМ является снижение уровня фотосинтетических пигментов, в том числе из-за подавления их биосинтеза [27]. В контрольных условиях листья растений ячменя содержали, в среднем, 0.77 мг/г хлорофилла *a*, 0.22 мг/г хлорофилла *b* и 0.19 мг/г каротиноидов. В ответ на действие мелатонина возрастало содержание хлорофиллов (*a*, *b*) и каротиноидов, причем степень увеличения определялась про-

Таблица 2. Влияние хлорида кадмия и мелатонина на параметры фотохимической активности ФС II листьев ячменя

№	Варианты	Y (II)	ETR	Y(NO)	Y(NPQ)	F_v/F_m
1	Контроль (ПС 7 сут)	0.65 ± 0.01	24.70 ± 1.18	0.22 ± 0.01	0.13 ± 0.001	0.84 ± 0.01
2	1 сут 10 мкМ мел + 6 сут ПС	0.65 ± 0.02	23.39 ± 0.85	0.22 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.83 ± 0.001
	% от контрольного значения	99	95	100	102	98
3	1 сут ПС + 6 сут 10 мкМ мел	0.64 ± 0.01	22.36 ± 0.34	0.22 ± 0.01	0.12 ± 0.001	0.83 ± 0.001
	% от контрольного значения	97	91	100	89	99
4	1 сут ПС + 6 сут 2 мкМ CdCl ₂	0.62 ± 0.01	23.03 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.79 ± 0.01*
	% от контрольного значения	94	93	112	110	94
5	1 сут 10 мкМ мел + 6 сут 2 мкМ CdCl ₂	0.65 ± 0.01	23.72 ± 0.33	0.23 ± 0.001	0.11 ± 0.01	0.81 ± 0.02
	% от контрольного значения	100	96	106	87	96
6	1 сут ПС + 6 сут (10 мкМ мел и 2 мкМ CdCl ₂)	0.67 ± 0.03	24.05 ± 1.00	0.21 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.80 ± 0.02
	% от контрольного значения	102	97	98	91	96

Примечание: * $P \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $P \leq 0.05$ при сравнении с CdCl₂.

должительностью воздействия. Так, при кратковременной обработке мелатонином содержание пигментов увеличивалось на 14–26%, тогда как при длительной – лишь на 4–7% (рис. 3). Воздействие хлорида кадмия оказывало значительное влияние на содержание в листьях фотосинтетических пигментов. Так, добавление 2 мкМ CdCl₂ в среду снижало количество хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов на 31, 18 и 24% соответственно (рис. 3).

В присутствии мелатонина в среде, содержащей хлорид кадмия, количество хлорофиллов (*a*,

b) и каротиноидов на 9–14 и 11% соответственно, превышало содержание этих пигментов в листьях растений, находившихся в аналогичных условиях, но в отсутствие мелатонина. Однако прайминг мелатонином был более эффективным для снижения токсического действия кадмия на содержание хлорофиллов: количество хлорофилла *a* возрастало на 18% (0.67 мг/г) относительно варианта с хлоридом кадмия (0.53 мг/г), а количество хлорофилла *b* (0.21 мг/г) было практически равно контрольному значению.

Влияние хлорида кадмия и мелатонина на перекисное окисление липидов и антиоксидантный статус растений ячменя

Величину ПОЛ в растениях ячменя оценивали по содержанию продуктов, активных в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) при нагревании. В контрольных условиях листья растений ячменя содержали в среднем 39 нМ/г, стебли – 97 нМ/г, корни – 69 нМ/г сырой массы ТБК-АП (рис. 4). В ответ на действие мелатонина достоверного роста или снижения уровня ТБК-АП не отмечено ни для кратковременной обработки, ни для длительной. Как видно из данных, представленных на рисунке 4, добавление 2 мкМ CdCl₂ в питательный раствор повышало содержание ТБК-АП на 49% в листьях и на 32% в стеблях и корнях, что свидетельствует о развитии в растениях ячменя окислительного стресса.

Прайминг мелатонином с последующим действием кадмия частично снижал ПОЛ, причем для листьев растений кратковременная предобработка была несколько эффективнее добавления мелато-

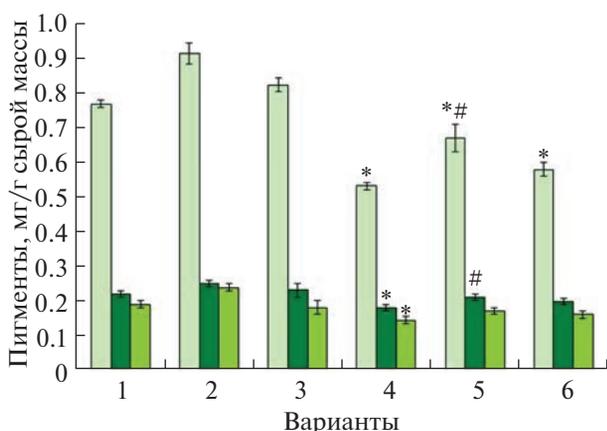


Рис. 3. Влияние хлорида кадмия и мелатонина на содержание пигментов в листьях ячменя. * $P \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $P \leq 0.05$ при сравнении с CdCl₂. 1 – контроль; 2 – мелатонин (1 сут); 3 – мелатонин (6 сут); 4 – CdCl₂ (6 сут); 5 – мелатонин (1 сут) + CdCl₂ (6 сут); 6 – мелатонин (6 сут) + CdCl₂ (6 сут).

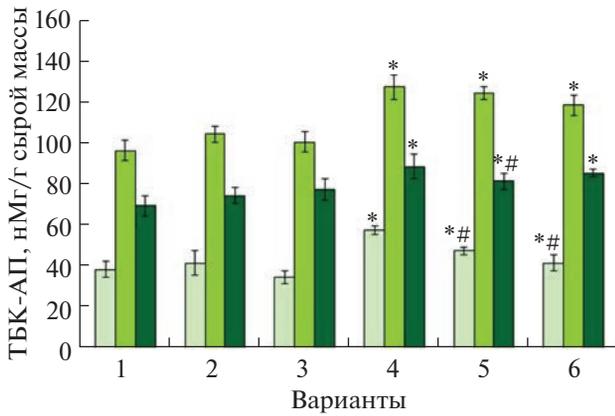


Рис. 4. Влияние хлорида кадмия и мелатонина на величину перекисного окисления липидов в разных частях растений ячменя. * $P \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $P \leq 0.05$ при сравнении с $CdCl_2$. 1 – контроль; 2 – мелатонин (1 сут); 3 – мелатонин (6 сут); 4 – $CdCl_2$ (6 сут); 5 – мелатонин (1 сут) + $CdCl_2$ (6 сут); 6 – мелатонин (6 сут) + $CdCl_2$ (6 сут).

нина в питательный раствор на фоне стрессора. Для снижения негативного влияния окислительного стресса в растениях активируются антиоксидантные защитные системы, действие которых направлено на гашение активных форм кислорода. Важными ферментами антиоксидантной системы являются СОД и ПО. Кратковременное и длительное воздействие мелатонина повышало активность СОД на 30 и 44% соответственно, в сравнении с контрольным вариантом. В ответ на действие хлорида кадмия в растениях ячменя увеличивалась активность СОД на 62% относительно контрольных значений (рис. 5а).

Прайминг растений мелатонином с последующим действием хлорида кадмия не вызывал достоверного увеличения активности СОД относительно действия только стрессора. Однако длительное воздействие мелатонина приводило к росту активно-

сти СОД на 96% относительно контрольных значений и на 34% относительно варианта с кадмием (рис.5а). Использование мелатонина в оптимальных условиях выращивания ячменя не приводило к достоверному изменению активности ПО, тогда как хлорид кадмия повышал активность ПО на 39% (рис. 5б). Прайминг мелатонином с последующим действием стрессора увеличивал изучаемый показатель на 60%. Длительное воздействие мелатонина достоверно увеличивало активность ПО не только относительно контроля, но и в сравнении с действием $CdCl_2$. Таким образом, длительное применение мелатонина было эффективнее прайминга для увеличения активности антиоксидантных ферментов (СОД и ПО) растений ячменя, подвергнутых воздействию кадмия.

Типичным ответом растений на стрессовые условия является накопление пролина [12] – аминокислоты, которая выполняет различные функции, в том числе осмопротектора, стабилизатора белка, хелатора металлов и антиоксиданта [28]. В оптимальных условиях выращивания мелатонин, вне зависимости от части растения и длительности обработки, достоверно не изменял содержание пролина в ячмене. Хлорид кадмия увеличивал накопление пролина в стеблях и корнях растений ячменя на 21 и 24% соответственно (рис. 6б, в). Прайминг мелатонином с последующим загрязнением среды способствовал увеличению содержания пролина в листьях и корнях ячменя не только относительно контрольных значений, но и по сравнению с действием стрессового фактора. Длительное воздействие мелатонина также усиливало накопление пролина в органах растений ячменя на фоне хлорида кадмия и продемонстрировало большую эффективность по сравнению с праймингом (рис. 6).

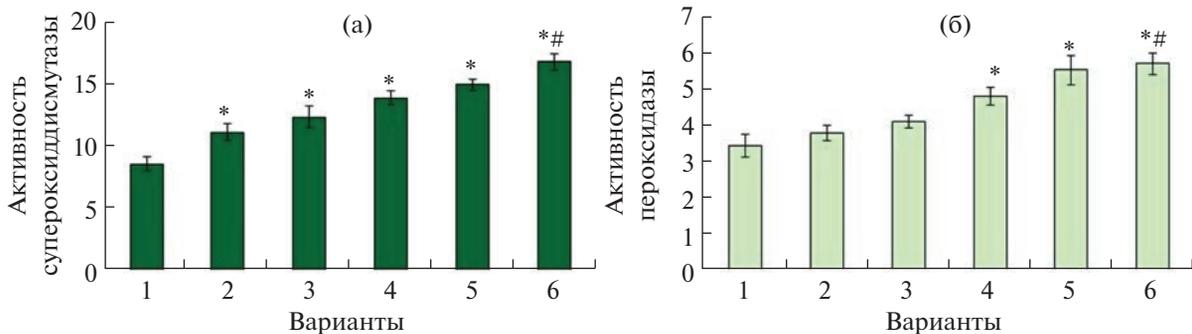


Рис. 5. Влияние хлорида кадмия и мелатонина на активность антиоксидантных ферментов в растениях ячменя. а – активность СОД, условных единиц/мг белка в минуту; б – активность ПО, условных единиц/мг белка в минуту; * $P \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $P \leq 0.05$ при сравнении с $CdCl_2$. 1 – контроль; 2 – мелатонин (1 сут); 3 – мелатонин (6 сут); 4 – $CdCl_2$ (6 сут); 5 – мелатонин (1 сут) + $CdCl_2$ (6 сут); 6 – мелатонин (6 сут) + $CdCl_2$ (6 сут).

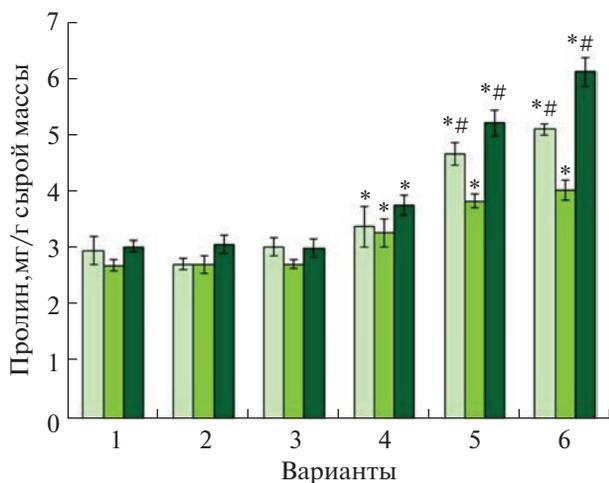


Рис. 6. Влияние хлорида кадмия и мелатонина на накопление пролина в разных частях растений ячменя. * $P \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $P \leq 0.05$ при сравнении с CdCl_2 . 1 – контроль; 2 – мелатонин (1 сут); 3 – мелатонин (6 сут); 4 – CdCl_2 (6 сут); 5 – мелатонин (1 сут) + CdCl_2 (6 сут); 6 – мелатонин (6 сут) + CdCl_2 (6 сут).

Влияние хлорида кадмия и мелатонина на накопление неорганических ионов в растениях ячменя

Было проанализировано содержание натрия, магния, калия, кальция, фосфора и кадмия в побегах и корнях растений ячменя в норме и в условиях “кадмиевого стресса”. Хлорид кадмия снижал количество ионов натрия на 52 и 13%, магния – на 15 и 19%, фосфора – на 19 и 25% для надземной (табл. 3) и подземной (табл. 4) частей растений, соответственно. Ожидается, что накопление ионов кадмия многократно возрастало как в корне, так и побегах ячменя – в среднем в 72 раза относительно контрольных значений (табл. 3, 4). Мелатонин вне зависимости от длительности применения на фоне действия 2 мкМ CdCl_2 восстанавливал содержание кальция в побегах растений ячменя. Кроме того, прайминг мелатонином с последующим “кадмиевым стрессом” приводил к снижению количества ионов кадмия в надземной части растений относительно действия кадмия в отсутствие мелатонина (табл. 3).

Таблица 3. Влияние хлорида кадмия и мелатонина на содержание неорганических ионов в побегах растений ячменя

№	Варианты	Содержание элементов, мкг/г					
		Na	Mg	K	Ca	P	Cd
1	Контроль (ПС 7 сут)	724 ± 4	2380 ± 115	60717 ± 1976	9196 ± 432	5302 ± 241	1.1 ± 0.05
2	1 сут 10 мкМ мел + 6 сут ПС	674 ± 35*	2493 ± 110	58900 ± 2623	9411 ± 421	5173 ± 194	1.2 ± 0.06
	% от контрольного значения	93	105	97	102	98	110
3	1 сут ПС + 6 сут 10 мкМ мел	703 ± 29	2271 ± 123	59314 ± 2849	9518 ± 470	5417 ± 263	0.9 ± 0.05*
	% от контрольного значения	97	95	98	104	102	82
4	1 сут ПС + 6 сут 2 мкМ CdCl_2	346 ± 18*	2014 ± 89*	49383 ± 2513*	7691 ± 375*	4279 ± 216*	80 ± 5*
	% от контрольного значения	48	85	81	84	81	7273
5	1 сут 10 мкМ мел + 6 сут 2 мкМ CdCl_2	305 ± 17*	2146 ± 109	53396 ± 2692*	9589 ± 502#	4234 ± 215*	50 ± 4*.#
	% от контрольного значения	42	89	88	104	80	4545
6	1 сут. ПС + 6 сут (10 мкМ мел и 2 мкМ CdCl_2)	285 ± 16*.#	1863 ± 97*	43059 ± 2217*	9797 ± 493#	4104 ± 209*	81 ± 5*
	% от контрольного значения	39	78	71	107	77	7364

Примечание: * $P \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $P \leq 0.05$ при сравнении с CdCl_2 .

Таблица 4. Влияние хлорида кадмия и мелатонина на содержание неорганических ионов в корнях растений ячменя

№	Варианты	Содержание элементов, мкг/г					
		Na	Mg	K	Ca	P	Cd
1	Контроль (ПС 7 сут)	6708 ± 349	3656 ± 190	18820 ± 1157	2931 ± 180	4663 ± 246	10 ± 0,8
2	1 сут 10 мкМ мел + 6 сут ПС	6512 ± 369	3794 ± 212	19386 ± 1094	2878 ± 158	4321 ± 249	8 ± 0.6
	% от контрольного значения	97	104	103	98	93	80
3	1 сут ПС + 6 сут 10 мкМ мел	6674 ± 349	3872 ± 231	17899 ± 904	3061 ± 162	4567 ± 238	11 ± 0.7
	% от контрольного значения	99	106	95	104	98	110
4	1 сут ПС + 6 сут 2 мкМ CdCl ₂	5856 ± 314*	2964 ± 157*	18614 ± 970	3222 ± 174	3495 ± 184*	737 ± 41*
	% от контрольного значения	87	81	99	110	75	7370
5	1 сут 10 мкМ мел + 6 сут 2 мкМ CdCl ₂	6103 ± 311	3504 ± 184	19658 ± 1037	3040 ± 167	3234 ± 169*	632 ± 37*
	% от контрольного значения	91	96	104	104	69	6320
6	1 сут ПС + 6 сут (10 мкМ мел и 2 мкМ CdCl ₂)	6224 ± 327	3913 ± 213 [#]	18004 ± 934	3304 ± 181	3302 ± 173*	682 ± 38*
	% от контрольного значения	93	107	96	113	71	6820

Примечание: * $P \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $P \leq 0.05$ при сравнении с CdCl₂.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение ответных реакций ячменя на действие хлорида кадмия позволяет оценить прямые токсические эффекты избыточных концентраций тяжелых металлов для злаковых культур. Действие хлорида кадмия приводило к значительному снижению содержания фотосинтетических пигментов. Одна из основных причин этого – подавление биосинтеза хлорофиллов *a*, *b* [27], происходящего, в основном, из-за ингибирования протохлорофиллид-редуктазы, которая является ключевым ферментом данного процесса [29].

Падение уровня пигментов в совокупности с уменьшением площади ассимилирующей поверхности и снижением активности фотосинтетических реакций ФС II свидетельствует об ингибировании процессов фотосинтеза. В связи с этим, способность мелатонина препятствовать деградации хлорофиллов *a*, *b* и поддерживать фотохимическую активность ФС II, тем самым задерживая старение листьев растений ячменя, как было показано нами ранее [30], является одним из защитных механизмов в условиях действия тяжелых металлов.

О стрессе, вызванном действием ионов кадмия, свидетельствует увеличение степени ПОЛ в органах растений ячменя. Антиоксидантные свойства мела-

тонина проявлялись в повышении активности антиоксидантных ферментов, а именно супероксиддисмутазы и гваякол-зависимой пероксидазы, а также в поддержании уровня каротиноидов, являющихся неферментативными антиоксидантами. Положительное влияние мелатонина на фотосинтетические пигменты возможно за счет повышения активности антиоксидантных ферментов, удаляющих активные формы кислорода. Многочисленные исследования демонстрируют, что мелатонин усиливает активность различных антиоксидантных ферментов и в ответ на другие стрессовые факторы. Так, экзогенный мелатонин повышал активность и концентрацию антиоксидантных ферментов, усиливая толерантность растений огурца к засолению (в концентрации 50–150 мкМ) [31], дыни – к низким температурам (в концентрации 50–400 мкМ) [32], арбуза – к загрязнению ванадием (в концентрации 0.1 мкМ) [13], гикори – к засухе (в концентрации 25–200 мкМ) [33].

Свидетельством снижения окислительного стресса экзогенным мелатонином является уменьшение степени ПОЛ в листьях растений ячменя на фоне действия стрессового фактора. Кроме того, для надземных органов кратковременная предобработка была эффективнее длительного воздействия мелатонина для снижения уровня ПОЛ.

В проведенном исследовании избыток кадмия в среде приводил к его многократному росту в корнях и побегах. Согласно полученным результатам, мелатонин не оказывал существенного влияния на накопление ионов кадмия в растениях ячменя, за исключением снижения накопления кадмия в побегах растений для варианта с предобработкой мелатонином и последующим “кадмиевым стрессом”. Экзогенное применение мелатонина ингибировало накопление Cd как в корнях, так и в листьях редьки [35], риса [36], сафлоры [37] и томатов [38]. Возможно, положительный эффект мелатонина для растений ячменя реализовывался не через влияние на накопление металла.

Нами показано, что в отношении некоторых защитных механизмов, например, поддержании уровня фотосинтетических пигментов и снижении перекисного окисления липидов на фоне действия хлорида кадмия, кратковременная прикорневая предобработка мелатонином была эффективнее его длительного воздействия. Данные о механизмах защиты растений мелатонином в ответ на действие ионов кадмия, а также оптимизация обработки растений с целью получения максимального защитного эффекта имеют значение не только для получения новых фундаментальных знаний, но и могут стать основой для разработки инновационных сельскохозяйственных технологий повышения продуктивности растений.

Постановка опыта была поддержана государственным заданием Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 122042700044-6). Оценка физиологических показателей была поддержана Российским научным фондом (РНФ, проект № 23-44-10019). Анализ накопления неорганических ионов в растениях ячменя выполнен при поддержке программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030, проект № 2.1.2.22).

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. *Clemens S., Ma J.F.* Toxic heavy metal and metalloid accumulation in crop plants and foods // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2016. V. 67. P. 489. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112301>
2. *Srivastava V., Sarkar A., Singh S., Singh P., de Araujo A.S.F., Singh R.* Agroecological responses of heavy metal pollution with special emphasis on soil health and plant performances // *Front. Environ. Sci.* 2017. V. 5. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00064>
3. *Danilova E.D., Zlobin I.E., Kuznetsov V.V., Efimova M.V.* Exogenous melatonin reduces the toxic effect of polymeric stress on barley plants // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2021. V. 499. P. 228. <https://doi.org/10.1134/S1607672921040049>
4. *Asgher M., Khan M.I.R., Anjum N.A., Khan N.A.* Minimising toxicity of cadmium in plants – role of plant growth regulators // *Protoplasma.* 2015. V. 252. P. 399. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0710-4>
5. *Muradoglu F., Gundogdu M., Ercisli S., Encu T., Balta F., Jaafar H., Zia-Ul-Haq M.* Cadmium toxicity affects chlorophyll *a* and *b* content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry // *Biological Res.* 2015. V. 48. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0001-3>
6. *Cho U.H., Seo N.H.* Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation // *Plant Sci.* 2005. V. 168. P. 113. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.021>
7. *Hussain I., Iqbal M., Qurat-Ul-Ain S., Rasheed R., Mahmood S., Perveen F., Wahid A.* Cadmium dose and exposure-time dependent alterations in growth and physiology of maize (*Zea mays*) // *Int. J. Agric. Biol.* 2012. V. 14. P. 959.
8. *El Rasafi T., Oukarroum A., Haddioui A., Song H., Kwon E.E., Bolan N., Tack F.M.G., Sebastian A., Prasad M.N.V., Rinklebe J.* Cadmium stress in plants: a critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2020. P. 1. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.183543>
9. *Bian M., Zhou M., Sun D., Li C.* Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants // *Crop J.* 2013. V. 1. P. 91. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2013.08.002>
10. *Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J.* Functions of melatonin in plants: a review // *J. Pineal Res.* 2015. V. 59. P. 133. <https://doi.org/10.1111/jpi.12253>
11. *Zhang Y.P., Yang S.J., Chen Y.Y.* Effects of melatonin on photosynthetic performance and antioxidants in melon during cold and recovery // *Biol. Plant.* 2017. V. 61. P. 571. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0717-8>
12. *Kholodova V.P., Vasil'ev S.V., Efimova M.V., Voronin P.Yu., Rakhmankulova Z.F., Danilova E.Yu., Kuznetsov V.V.* Exogenous melatonin protects canola plants from toxicity of excessive copper // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. T. 65. P. 882. <https://doi.org/10.1134/S1021443718060080>
13. *Nawaz M.A., Jiao Y., Chen C., Shireen F., Zheng Z., Imtiaz M., Bie Z., Huang Y.* Melatonin pretreatment improves vanadium stress tolerance of watermelon seedlings by reducing vanadium concentration in the leaves and regulating melatonin biosynthesis and antioxidant-related gene expression // *J. Plant Physiol.* 2018. V. 220. P. 115. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.11.003>
14. *Savvides A., Ali S., Tester M., Fotopoulos V.* Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible? // *Trends Plant Sci.* 2016. V. 21. P. 329. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.003>
15. *Blamey F.P.C., Hernandez-Soriano M.C., Cheng M., Cheng M., Tang C., Paterson D.J., Lombi E., Wang W.H., Scheckel K.G., Koppitke P.M.* Synchrotron-based techniques shed light on mechanisms of plant sensitivity

- and tolerance to high manganese in the root environment // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 2006. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00726>
16. Danilova E.D., Litvinovskaya R.P., Zlobin I.E., Kolomeichuk L.V., Murgan O.K., Sauchuk A.L., Khripach V.A., Kuznetsov V.V., Efimova M.V. Polymetallic stress changes the endogenous status of brassinosteroids and reduces the effectiveness of photochemical reactions photosystem II in barley plants // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2022. V. 504. P. 123. <https://doi.org/10.1134/S1607672922030024>
 17. Kopittke P.M., Blamey F.P.C., Asher C.J., Menzies N.W. Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 945. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp385>
 18. Li Z., Wang P., Menzies N.W., Kopittke P.M. Defining appropriate methods for studying toxicities of trace metals in nutrient solutions // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 147. P. 872. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.044>
 19. Аникеев В.В., Кутузов Ф.Ф. Новый способ определения листовой поверхности у злаков // *Физиология растений.* 1961. Т. 8. С. 375.
 20. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Biomembrans.* 1978. V. 52. P. 302. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
 21. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Plant Cell.* 1987. P. 350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
 22. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. P. 205. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
 23. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
 24. Shevyakova N.I., Stetsenko L.A., Meshcheryakov A.B., Kuznetsov V.I.V. The activity of the peroxidase system in the course of stress-induced CAM development // *Russ. J. Plant Physiol.* 2002. V. 49. P. 598. <https://doi.org/10.1023/A:1020224531599>
 25. Esen A.A. Simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein // *Anal. Biochem.* 1978. V. 89. P. 264. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90749-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90749-2)
 26. Ruban A.V. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage // *Plant Physiol.* 2016. V. 170. P. 1903. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01935>
 27. Yan H., Jia S., Mao P. Melatonin priming alleviates aging-induced germination inhibition by regulating β -oxidation, protein translation, and antioxidant metabolism in oat (*Avena sativa* L.) seeds // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms21051898>
 28. Mehta V., Kansara R., Srivastav V., Savaliya P. A novel insight into phytoremediation of heavy metals through genetic engineering and phytohormones // *J. Nanosci. Nanomed. Nanobio.* 2021. V. 4. P. 1.
 29. Sadak M.S., Abdalla A.M., Abd Elhamid E.M., Ezzo M.I. Role of melatonin in improving growth, yield quantity and quality of *Moringa oleifera* L. plant under drought stress // *Bull. Natl. Res. Cent.* 2020. V. 44. P. 1.
 30. Danilova E.D., Efimova M.V., Kolomeichuk L.V., Kuznetsov V.V. Melatonin supports photochemical activity of assimilation apparatus and delays senescence of leaves of monocotyledonous plants // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 495. P. 271. <https://doi.org/10.1134/S1607672920050051>
 31. Wang L.Y., Liu J.L., Wang W.X., Sun Y. Exogenous melatonin improves growth and photosynthetic capacity of cucumber under salinity-induced stress // *Photosynthetica.* 2016. V. 54. P. 19. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0140-3>
 32. Zhang Y.P., Yang S.J., Chen Y.Y. Effects of melatonin on photosynthetic performance and antioxidants in melon during cold and recovery // *Biol. Plant.* 2017. V. 61. P. 571. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0717-8>
 33. Sharma A., Zheng B. Melatonin mediated regulation of drought stress: physiological and molecular aspects // *Plants.* 2019. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.3390/plants8070190>
 34. Hoqu M., Tahjib-Ul-Arif M., Hannan A., Sultana N., Akhter S., Hasanuzzaman M., Akter F., Hossain M.S., Sayed M.A., Hasan M.T., Skalicky M., Li X., Brestic M. Melatonin modulates plant tolerance to heavy metal stress: Morphological responses to molecular mechanisms // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 21. P. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms222111445>
 35. Xu L., Zhang F., Tang M., Wang Y., Dong J., Ying J., Chen Y., Hu B., Li C., Liu L. Melatonin confers cadmium tolerance by modulating critical heavy metal chelators and transporters in radish plants // *J. Pin. Res.* 2020. V. 69. P. 1. <https://doi.org/10.1111/jpi.12659>
 36. Jiang M., Dai S., Wang B., Xie Z., Li J., Wang L., Li S., Tana Y., Tian B., Shu Q., Huang J. Gold nanoparticles synthesized using melatonin suppress cadmium uptake and alleviate its toxicity in rice // *Enviro. Sci. Nano.* 2021. V. 8. P. 1042.
 37. Amjadi Z., Namdjoyan S., Soorki A.A. Exogenous melatonin and salicylic acid alleviates cadmium toxicity in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seedlings // *Ecotoxicol.* 2021. V. 30. P. 387. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02364-y>
 38. Hasan M.K., Ahammed G.J., Sun S., Li M., Yin H., Zhou J. Melatonin inhibits cadmium translocation and enhances plant tolerance by regulating sulfur uptake and assimilation in *Solanum lycopersicum* L. // *J. Agric. Food Chem.* 2019. V. 67. P. 10563. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b0240>

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ И СУЛЬФАТА МЕДИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *Thalassiosira weissflogii* В УСЛОВИЯХ НАКОПИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2023 г. А. И. Акимов^а, *, Е. С. Соломонова^а, Н. Ю. Шоман^а, О. А. Рылькова^а

^а Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, Россия

*e-mail: arkady.akimov@gmail.com

Поступила в редакцию 28.12.2022 г.

После доработки 10.01.2023 г.

Принята к публикации 12.01.2023 г.

Исследовано влияние наночастиц оксида меди (500, 1000, 2000 мкг/л) и ионов меди (37.5, 75, 150 мкг/л) на морфологические, структурно-функциональные и флуоресцентные параметры диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* в условиях длительного культивирования. Показано, что медь в ионной форме более токсична для данного вида микроводоросли, чем в виде наноксида. Характер воздействия меди в ионной и наноформе на клетки *Thalassiosira weissflogii* имел как схожие черты, так и существенные отличия. Выявлено различие в действие исследуемых токсикантов на рост водорослей и работу их фотосинтетического аппарата. Добавление ионов меди в культивационную среду приводило к длительной лаг-фазе на начальном этапе эксперимента с последующим восстановлением роста на 3–6 сут экспозиции. Увеличение концентрации наночастиц оксида меди в среде вызывало торможение роста водорослей без выраженной лаг-фазы. С ростом концентрации Cu^{2+} в культуральной среде наблюдалось снижение квантовой эффективности утилизации световой энергии фотосинтетическим комплексом ФС II и относительной максимальной скорости электронного транспорта, тогда как наночастицы оксида меди слабо влияли на эффективность работы фотосинтетического аппарата *Thalassiosira weissflogii*. При повышении концентрации меди как в ионной форме, так и в форме наноксида у водорослей отмечено увеличение объема клеток, изменение их формы и гранулярности, увеличение продукции активных форм кислорода, подавление ферментативной активности и снижение значений автофлуоресценции отдельных клеток в красной области спектра.

Ключевые слова: *Thalassiosira weissflogii*, накопительное культивирование, наночастицы оксида меди, ионы меди, клеточная морфология, проточная цитометрия, фотосинтетический аппарат, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S0015330322600826, **EDN:** PZQKPK

ВВЕДЕНИЕ

Особый интерес к меди в экотоксикологических исследованиях обусловлен тем, что она относится к эссенциальным микроэлементам, участвующим во многих метаболических и физиологических процессах клеток растений [1, 2]. Вместе с тем высокие концентрации меди оказывают токсическое воздействие на клетки, что приводит к ингибированию роста водорослей [3, 4], повреждению фотосинтетического аппарата [5, 6], увеличению среднего объема клеток [4], потере клеточной подвижности [7] и ряду других структурных и функциональных изменений. Анализ литературных данных показал, что к настоящему времени накоплен огромный фактический материал, касаю-

щийся как оценки действия меди на морские одноклеточные водоросли [8, 9], так и их адаптационного отклика на воздействие этого поллютанта за счет внутренних и/или внешних механизмов детоксикации [10]. Увеличение продукции внеклеточных хелаторов в ответ на присутствие токсиканта, иммобилизация металла путем связывания на поверхности клетки или с помощью внеклеточного слизистого слоя полисахаридов — это основные примеры внешних защитных механизмов микроводорослей, препятствующих проникновению металлов внутрь клеток. В свою очередь к внутриклеточным механизмам детоксикации металлов следует отнести связывание ионов с небелковыми тиоловыми соединениями, накопление метал-

лов в полифосфатных тельцах и выведение их из клетки.

В последние десятилетия для водных экосистем появилась новая угроза – загрязнение медью в наноформе с размером частиц менее 100 нм. Бурное развитие нанотехнологической промышленности и экспоненциальный рост производства наночастиц металлов и их оксидов, используемых практически во всех отраслях человеческой деятельности [11], привело к увеличению объемов поступления данного поллютанта в водную среду. Количество инженерных продуктов, содержащих в своем составе наночастицы (НЧ), увеличилось в 91 раз в период с 2005 по 2020 гг. [12]. Мировое ежегодное производство НЧ оксида меди (CuO НЧ) в 2014 г. составляло примерно 570 т/год и, по прогнозам, к 2025 г. составит 1600 т/год [13]. CuO НЧ в основном используются в качестве биоцидов [14], в сельском хозяйстве [15], входят в состав большинства противообрастающих красок [16]. Масштаб проблемы и опасность наночастиц металлов для живых организмов начали признавать к концу 2000-х гг. [17]. Этим объясняется наблюдаемый в последние годы рост количества публикуемых экспериментальных исследований, посвященных оценке воздействия НЧ оксида меди на живые организмы и, в частности, на микроводоросли как первично-продукционное звено водных биоценозов [18–20]. Большинство исследований посвящено оценке краткосрочного (в первые 72 ч культивирования) воздействия поллютанта и определению концентраций НЧ CuO , угнетающих и/или останавливающих рост микроводорослей [18, 21]. Однако не менее важным является выявление причин, лежащих в основе изменений физиологического состояния клетки при воздействии поллютанта и в конечном итоге вызывающих снижение ее ростовых и продукционных характеристик. Для этого целесообразно проведение длительных экспериментов, включающих оценку динамики основных структурно-функциональных показателей микроводорослей при разной концентрации загрязняющего вещества в среде. Кроме того, неясным остается вопрос сравнительной оценки воздействия меди в ионной и наноформе на растительную клетку. В литературных источниках нам удалось найти лишь несколько исследований, посвященных сравнению воздействия CuSO_4 и НЧ CuO для одного вида водорослей в одинаковых условиях культивирования [22, 23].

Цель работы – оценка физиологического отклика диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* при длительном культивировании в среде с наночастицами оксида меди и ионами меди разной концентрации. Для достижения поставленной цели решали следующие задачи: 1) оценить динамику ростовых, структурных, флуоресцентных и цитометрических показателей водорослей при различных концентрациях меди в ионной и нанофор-

ме; 2) оценить влияние внесенной концентрации поллютанта на конечную плотность культуры в стационарной фазе роста; 3) определить пороговые концентрации Cu^{2+} и НЧ CuO , ингибирующие рост и потенциальную фотосинтетическую активность *Thalassiosira weissflogii*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве объекта исследования была использована альгологически чистая культура морской диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G.A. Fryxell & Hasle 1977 из коллекции живых культур морских планктонных микроводорослей (IBSS) научно-образовательного центра коллективного пользования “Гидробионты мирового океана” (WDCM № 1201) Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”.

Условия проведения экспериментов. В ходе эксперимента водоросли выращивали на разбавленной в 5 раз питательной среде Гольдберга без добавления меди и ЭДТА, способного связывать растворенные в воде ионы металлов в хелатные комплексы, тем самым уменьшая их активность и токсическое действие на клетки (ГОСТ 31960-2012). Используемая концентрация питательной среды обеспечивала экспоненциальный рост водорослей в контрольных склянках в течение 5–6 сут при начальной концентрации клеток около 9×10^3 кл./мл.

Культивирование водорослей проводили в конических колбах с объемом культуральной суспензии 150 мл при интенсивности света $85 \text{ мкЭ}/(\text{м}^2 \text{ с})$, свето-темновом периоде 14/10 ч и температуре 20°C . Освещение колб осуществляли снизу светодиодами холодного света. Уровень освещенности определяли зондирующим 4π датчиком квантометра QSL 2101 (“Biospherical Instruments Inc.”, США). Барботаж культур осуществляли аквариумными компрессорами, величина рН культуральной среды находилась в пределах 8.2–8.5. Предварительно до начала эксперимента водоросли адаптировали к заданным абиотическим условиям роста в течение 3 сут. При этом плотность культуры поддерживали на постоянном уровне путем ежедневного разбавления свежей питательной средой. После периода адаптации в экспериментальные колбы вносили растворы поллютантов. Дальнейшее культивирование водорослей проводили в накопительном режиме. Измерение всех исследуемых параметров проводили ежедневно в течение 12 сут.

В качестве токсиканта использовали сульфат меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ACS reagent, $\geq 98.0\%$, “Sigma-Aldrich”, США) и нанопорошок оксида меди CuO (“Sigma-Aldrich”, США) со средним размером частиц 50–80 нм. Из маточного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

готовили растворы токсиканта с концентрациями 37,5, 75, 150 мкг/л (в пересчете на ионы Cu^{2+}). Маточный раствор, содержащий наночастицы оксида меди, предварительно обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвуковой ванны УЗВ-1.3 (“Сапфир”, Россия) в течение 1 ч для диспергирования частиц. Концентрация наночастиц оксида меди в разных вариантах эксперимента составляла 500, 1000, 2000 мкг/л (в пересчете на ионы Cu^{2+}). Выбор исследуемых концентраций токсикантов обусловлен предварительно полученными данными о степени токсичности меди на данный вид водорослей. В качестве контроля применяли водоросли, культивируемые на среде без добавления меди. В каждом варианте опыта использовали по три экспериментальные колбы.

Методы измерения. Цитометрический анализ проб проводили в центре коллективного пользования “Спектрометрия и хроматография” Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” на проточном цитометре MACS Quant Analyzer (“Miltenyi Biotec”, Германия), оборудованном тремя лазерами (405 нм, 488 нм, 635 нм). Для обработки данных использовали программу FSC Express 7 Research Edition. Общую численность микроводорослей в культурах определяли согласно методике, описанной нами ранее [24].

Удельную скорость роста микроводорослей рассчитывали по уравнению (1):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}, \quad (1)$$

где μ – удельная скорость роста водорослей, сут^{-1} ; N_0 и N_t – исходная концентрация клеток и их количество через время t , $\text{клеток} \cdot \text{л}^{-1}$; t – время между измерениями, сут .

Производство активных форм кислорода (АФК) у *Th. weissflogii* оценивали по флуоресценции красителя 2–7-дихлорфлуоресцеиндиацетат (H2DCF-DA; “Merck”, Германия). H2DCF-DA – клеточно-проницаемый индикатор АФК, наиболее часто используемый для их количественной оценки [25]. Окраску суспензии клеток проводили в соответствии с [25]. Интенсивность флуоресценции H2DCF-DA оценивали по свечению клеток в зелёной области спектра, 525 нм, предварительно вычитали значение автофлуоресценции клеток *Th. weissflogii* в данной области спектра.

Метаболическую активность клеток (относительная величина) оценивали на двух параметрических цитограммах по флуоресценции FDA (диацетатфлуоресцеина) (канал FL1 в зелёной области спектра, 525 нм) и автофлуоресценции клеток в красной области (FL4) спектра на безразмерных логарифмических шкалах. FDA, в состав которого входит субстрат, специфичен к ферментам груп-

пы эстераз, является маркером метаболической активности в живых клетках, а интенсивность его флуоресценции пропорциональна физиологической активности каждой из исследуемых клеток [24]. Окрашивание водорослей витальным красителем диацетатом флуоресцеина (FDA) производили по протоколу [24]. Рассчитывали среднее значение аккумулятивной флуоресценции FDA на клетку, предварительно вычитали значения автофлуоресценции клеток *Th. weissflogii* в данной области спектра.

Измерение флуоресценции пигментного комплекса водорослей проводили на флуориметре с импульсной модуляцией возбуждающего света на длине волны 455 нм “Мега–25м”, разработанном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (производитель ООО “Генная и клеточная терапия”, г. Москва, Россия) [26]. Перед измерением пробы выдерживали 15 мин в темноте.

Относительную вариабельную флуоресценцию, характеризующую максимальную квантовую эффективность использования световой энергии, рассчитывали по формуле (2):

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m, \quad (2)$$

где F_0 – величина флуоресценции хлорофилла a при открытых реакционных центрах, измеренная через 2,5 мкс от начала облучения с интенсивностью 5000 мкЭ/($\text{м}^2 \text{с}$); F_m – максимальная флуоресценция хлорофилла a при закрытых реакционных центрах, измеренная через 1 с от начала облучения с интенсивностью 5000 мкЭ/($\text{м}^2 \text{с}$).

Относительную максимальную скорость электронного транспорта ФС II при интенсивности света 500 мкЭ/($\text{м}^2 \text{с}$) и длительности экспозиции 40 с рассчитывали по формуле (3):

$$r\text{ETR} = \frac{F'_m - F'_0}{F'_m} I, \quad (3)$$

где F'_m – максимальная флуоресценция хлорофилла a на фоне постоянного освещения; F'_0 – нулевая флуоресценция хлорофилла a при постоянном освещении; I – интенсивность постоянного освещения.

Определение концентрации хлорофилла a в пробе проводили флуориметрическим методом [27]. Измерения флуоресценции осуществляли на лабораторном флуориметре с импульсной модуляцией возбуждающего света на длине волны 455 нм “Мега-25м” (“Генная и клеточная терапия”, Россия). Предварительная калибровка флуориметра была проведена по хроматографическому чистому хлорофиллу a (“Sigma”, США), исходную концентрацию которого определяли на спектрофотометре СФ-2000 (“ЛОМО”, Россия). Расчет

удельного содержания хлорофилла *a* (пг/кл.) в клетках водорослей производили путем деления суммарной концентрации данного пигмента на численность клеток культуры для каждого отдельного случая. Также рассчитывали выход флуоресценции на единицу хлорофилла *a* ($F_m/Xл$, где F_m – максимальная флуоресценция хлорофилла *a* при закрытых реакционных центрах, $Xл$ – суммарная концентрация пигмента в пробе).

Микроскопия. Для световой микроскопии (СМ) использовали микроскоп Микмед-6 (“ЛОМО”, Россия), при увеличении $\times 1000$, с цифровой камерой МС-6.3 (“ЛОМО”, Россия), снабженный компьютерным программным обеспечением МСView (“ЛОМО-Микросистемы”, Россия) на базе ЦКП “Молекулярная структура вещества” Севастопольского государственного университета. Размеры клеток определяли по микрофотографиям с помощью программы Image J 1.50i (National Institutes of Health, США, Java 1.6.0_20 (32-bit)). Объем рассчитывали по формуле цилиндра [28].

При подготовке образцов для сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) использовали протокол [29]. Для сушки образцов в критической точке (1.5–2.5 ч) использовали устройство Leica EM SPD300 (Германия). Для напыления (Au/Pd; 0.5–1.0 мин) применяли прибор Leica EM ACE200 (Германия). Просматривали образцы с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония), при увеличении от $\times 500$ до $\times 5000$. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) выполнена с помощью детектора рентгеновского излучения Oxford instruments ULTIMAX 65 (Великобритания).

Статистический анализ. Статистическая обработка данных выполнялась по стандартным программным пакетам “Microsoft Excel 7.0” (Microsoft Office), “Grapher-16” (Golden Software). Значения, указанные на графиках и в таблице, представляют собой среднее трех измерений. Достоверность различий между выборками оценивали по *t*-критерию Стьюдента при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ионов меди Cu^{2+} и наночастиц оксида меди CuO на динамику численности *Thalassiosira weissflogii* в условиях накопительного культивирования

На рисунке 1 представлена динамика изменения численности культуры *Thalassiosira weissflogii* при добавлении в среду ионов меди Cu^{2+} и наночастиц оксида меди разной концентрации. Внесение в культивационную среду Cu^{2+} приводило к замедлению скорости роста водорослей вплоть до полной остановки деления клеток при концен-

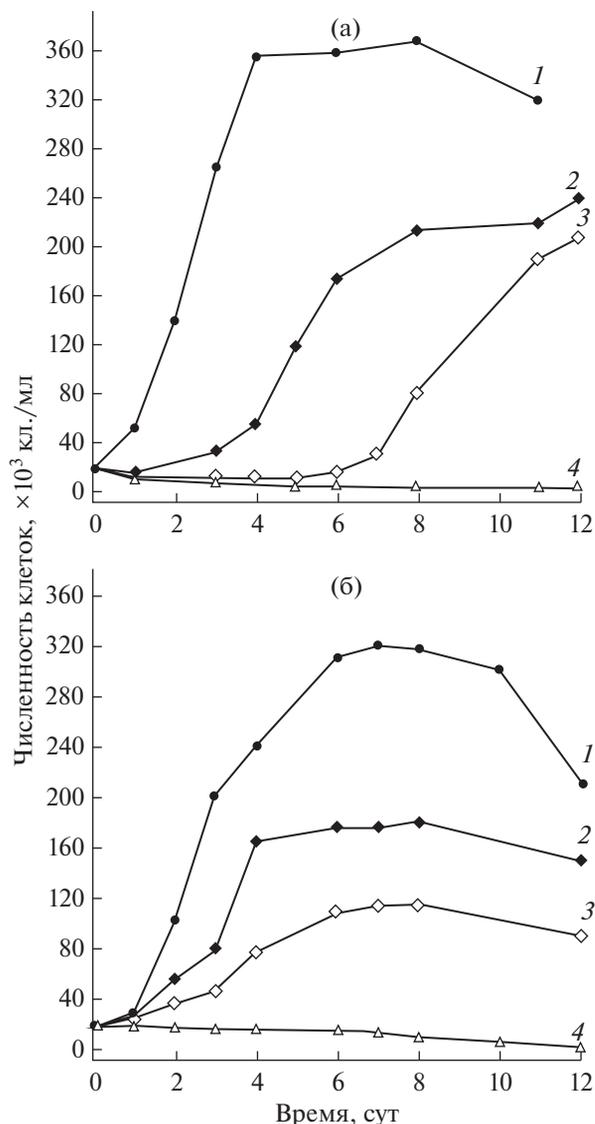


Рис. 1. Динамика численности клеток *Thalassiosira weissflogii* при различных концентрациях Cu^{2+} (а): 0 мкг/л (1), 35.5 мкг/л (2), 75 мкг/л (3) и 150 мкг/л (4) и наночастиц оксида меди (б): 0 мкг/л (1), 500 мкг/л (2), 1000 мкг/л (3) и 2000 мкг/л (4).

трации поллютанта 150 мкг/л. Такая концентрация меди была летальной для *Th. weissflogii* и способствовала быстрой необратимой деградации исследуемой культуры. При внесении в среду ионов меди в более низких концентрациях 37.5 и 75 мкг/л наблюдалась длительная лаг-фаза роста: 3 и 6 сут, соответственно. Кроме того, при концентрации Cu^{2+} 75 мкг/л на начальном этапе эксперимента отмечена частичная элиминация клеток в культуре, однако на 5–6 сут рост *Th. weissflogii* возобновлялся. На участке экспоненциального роста водорослей их удельная скорость роста составляла 1.1, 0.7 и 0.6 сут⁻¹ в вариантах без добавления меди,

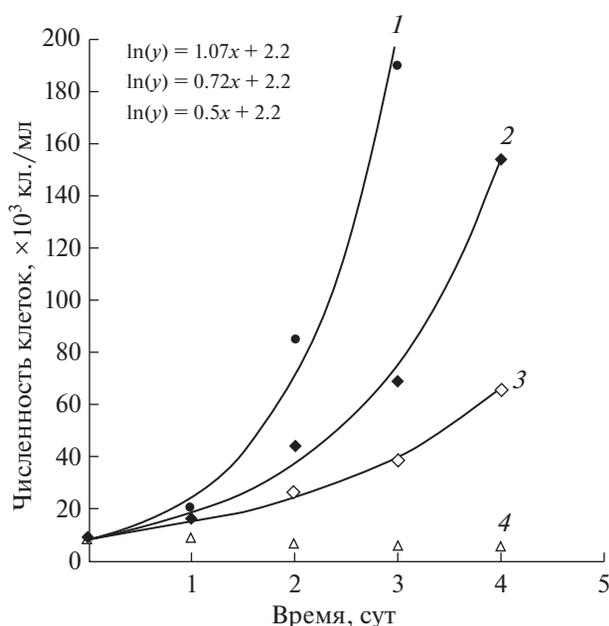


Рис. 2. Динамика численности клеток *Thalassiosira weissflogii* в культуральной среде в экспоненциальной фазе роста при различном содержании наночастиц оксида меди: 0 мкг/л (1), 500 мкг/л (2), 1000 мкг/л (3) и 2000 мкг/л (4).

при концентрации меди 37.5 и 75 мкг/л соответственно.

При добавлении наночастиц CuO в культуральную среду в концентрациях 500 и 1000 мкг/л водоросли имели положительную динамику роста, однако, также как и в случае с ионами меди, наблюдалось снижение удельной скорости роста при увеличении концентрации поллютанта. Так, в контрольном варианте опыта без добавления

НЧ удельная скорость роста составляла 1.1 сут⁻¹, а при концентрациях НЧ CuO 500 и 1000 мкг/л она снижалась до 0.7 и 0.5 сут⁻¹ соответственно. Однако, в отличие от ионов меди, добавление наночастиц CuO не вызывало длительную лаг-фазу и начальный рост исследуемой культуры аппроксимировался нами по экспоненциальной зависимости для каждого эксперимента в отдельности, что показано на рисунке 2. При концентрации наночастиц CuO 2000 мкг/л наблюдалась гибель культуры *Th. weissflogii*.

Конечная плотность культур в стационарной фазе роста также зависела от внесенной концентрации поллютанта: закономерно снижалась с повышением исходного содержания меди как в ионной, так и в наноформе в среде. В контрольном варианте эксперимента без добавления меди численность *Th. weissflogii* в стационарной фазе роста составила 3.6×10^5 кл./мл. В то время как при добавлении в среду Cu²⁺ в концентрации 37.5 и 75 мкг/л конечная плотность культур снижалась до 2.5 и 2×10^5 кл./мл, соответственно. Максимальная наблюдаемая численность *Th. weissflogii* при внесении НЧ CuO в концентрациях 500 и 1000 мкг/л составила 1.7 и 1.1×10^5 кл./мл соответственно.

Влияние ионов меди и наночастиц оксида меди на морфологию клеток *Th. weissflogii*

При увеличении содержания поллютанта в среде отмечено возрастание структурной неоднородности клеток относительно контроля, наблюдаемое по увеличению индекса бокового рассеяния SS по измерениям на проточном цитометре (табл. 1, 2). Максимальные величины бокового

Таблица 1. Ростовые и флуоресцентные параметры клеток *Thalassiosira weissflogii* при культивировании в среде с CuSO₄ на третьи и шестые сутки эксперимента

Концентрация Cu ²⁺ , мкг/л	Сутки эксперимента	N _{ккл.} × 10 ³ , кл./мл	μ, сут ⁻¹	Xл, пг/кл	F _m /Xл	гETR*	F _v /F _m	FL4	FS	SS	FDA	АФК
0	3 сут	265	1.1	1.43	7.7	0.48	0.77	67	55	33	146	76
	6 сут	399		1.38	8.1	0.49	0.74	68	57	32	109	
37.5	3 сут	32	0.7	1.5	7.5	0.43	0.68	66	60	40	118	81
	6 сут	173		1.32	7	0.45	0.71	64	58	38	98	
75	3 сут	10	-0.1	1.06	6.4	0.24	0.64	52	66	55	63	75
	6 сут	16	0.6	1.36	5.3	0.41	0.69	60	61	43	90	
150	3 сут	6		0.61	3.9	0.18	0.41	38	74	63	58	
	6 сут	3		0.42	2.6	0.08	0.29	33	78	86	41	180

Примечание: N_{ккл.} — число клеток; μ — удельная скорость роста; Xл — удельное содержание хлорофилла *a*; F_m/Xл — выход флуоресценции на единицу хлорофилла *a*; гETR — относительная максимальная скорость электронного транспорта при освещенности 500 мкЭ / (м² с); F_v/F_m — максимальный квантовый выход флуоресценции; FL4 — автофлуоресценция хлорофилла *a* на клетку на длине волны 680 нм; FS — прямое светорассеяние; SS — боковое светорассеяние клеток (гранулярность); FDA — среднее значение флуоресценции FDA на клетку; АФК — активные формы кислорода.

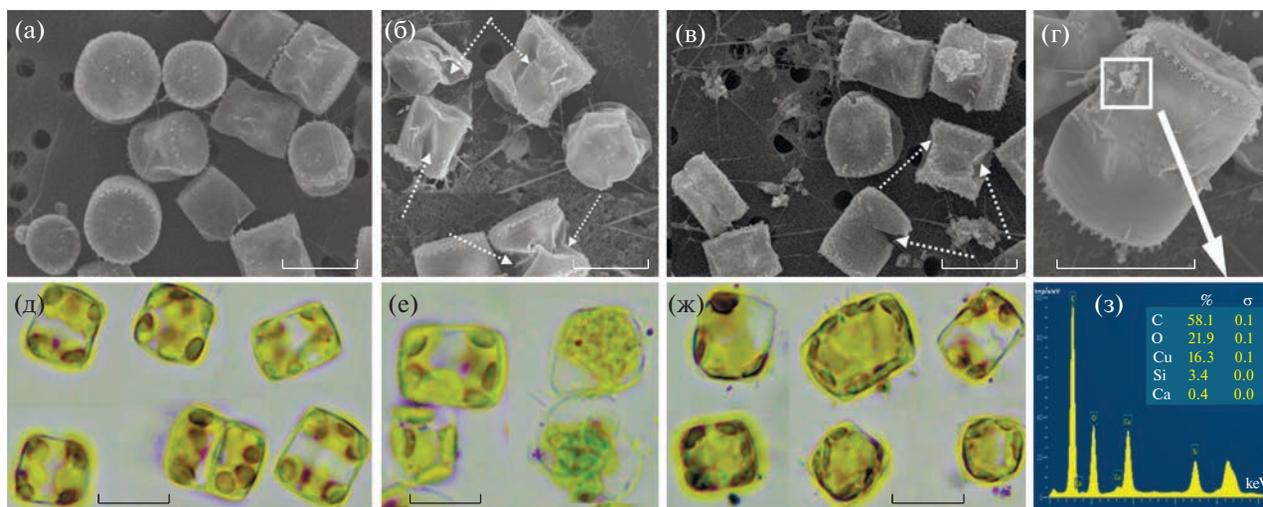


Рис. 3. Микрофотографии *Thalassiosira weissflogii* при различных условиях культивирования: а – нативная проба (контроль); б – культивирование с добавлением Cu^{2+} 75 мкг/л; в, г – культивирование с добавлением НЧ CuO 1000 мкг/л (по данным СЭМ); д – контроль, е – культивирование с добавлением Cu^{2+} 75 мкг/л; ж – культивирование с добавлением CuO НЧ 1000 мкг/л (по данным СМ), з – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия. Масштабная линейка соответствует 10 мкм.

светорассеяния у *Th. weissflogii* отмечены при культивировании водорослей с концентрацией НЧ CuO 1000 мкг/л и выше. Это, вероятно, обусловлено механическим воздействием наночастиц, приводящим к деформации клеток и их ультраструктурным повреждениям. Подтверждением этому являются изображения, полученные с применением световой и сканирующей электронной микроскопии (рис. 3). Так, морфометрические исследования нативной пробы (контроль) *Th. weissflogii* показали, что клетки имели правильную цилиндрическую форму со вставочным ободком (рис. 3а). В то же время клетки, подвергшиеся воздействию CuO НЧ в концентрации 1000 мкг/л и Cu^{2+} 75 мкг/л, имели ряд морфологических изменений, включая деформацию поясной полосы, неправильные клеточные контуры и сжатие самих клеток (при воздействии наночастиц оксида

меди) (рис. 3б, в). Количество деформированных клеток составляло порядка 30 и 50% исследуемой культуры при добавлении ионов меди и НЧ, соответственно. Отмечено выраженное механическое воздействие НЧ CuO на поверхность клеточной стенки *Th. weissflogii*, белыми пунктирными стрелками на микрофотографиях (СЭМ) обозначены места очевидных повреждений. Кроме того, наблюдалась адсорбция агрегатов, предположительно НЧ CuO , на поверхности клеток *Th. weissflogii* (рис. 3г). Элементный анализ этих агрегатов с применением энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии подтвердил наличие меди в их составе (рис. 3з). Адсорбция НЧ происходит за счет электростатических взаимодействий и химических связей на поверхности клеток микроводорослей [30]. Подобного рода реакция на присутствие в среде металлических наночастиц является

Таблица 2. Ростовые и флуоресцентные параметры клеток *Thalassiosira weissflogii* при культивировании в среде с наночастицами оксида меди на третьи сутки эксперимента

Концентрация Cu^{2+} , мкг/л	$N_{\text{кл.}} \times 10^3$, кл./мл	μ , сут ⁻¹	$X_{\text{л}}$, пг/кл	$F_m/X_{\text{л}}$	$r\text{ETR}^*$	F_v/F_m	FL4	FS	SS	FDA	АФК
0	190	1.1	1.3	7.1	0.46	0.78	64	57	33	123	78
500	69	0.7	1.2	7.2	0.4	0.75	65	60	36	100	79
1000	39	0.5	1.18	5.7	0.38	0.73	55	65	78	69	91
2000	6	0	0.6	3.5	0.22	0.59	42	73	117	48	118

Примечание: $N_{\text{кл.}}$ – число клеток; μ – удельная скорость роста; $X_{\text{л}}$ – удельное содержание хлорофилла *a*; $F_m/X_{\text{л}}$ – выход флуоресценции на единицу хлорофилла *a*; $r\text{ETR}^*$ – относительная максимальная скорость электронного транспорта при освещенности 500 мкЭ / (м² с); F_v/F_m – максимальный квантовый выход флуоресценции; FL4 – автофлуоресценция хлорофилла *a* на клетку на длине волны 680 нм; FS – прямое светорассеяние; SS – боковое светорассеяние клеток (гранулярность); FDA – среднее значение флуоресценции FDA на клетку; АФК – активные формы кислорода.

типичной и наблюдается у многих других видов микроводорослей [17–22].

Анализ проб с применением световой микроскопии позволил выявить изменения внутренней структуры клеток после воздействия исследуемых поллютантов. Так, в контрольном образце цитоплазма клеток *Th. weissflogii* плотно прилегала к плазмолемме, а внутриклеточные компоненты были не повреждены и четко структурированы (рис. 3д). В то время как у водорослей, культивируемых на среде с добавлением 1000 мкг/л НЧ CuO и 75 мкг/л Cu^{2+} , была отмечена ретракция (втягивание) цитоплазмы и ее отделение от клеточной стенки. Кроме того, в культуре в большом количестве наблюдались полупрозрачные клетки с частично или полностью разрушенным содержимым (рис. 3е, ж). Средний объем клеток в контроле составлял $871 \pm 81 \text{ мкм}^3$. При воздействии сублетальной концентрации меди (75 мкг/л) он достоверно увеличивался в 1.6 раза до $1373 \pm 177 \text{ мкм}^3$ (непарный *t*-тест, $P < 0.05$) по сравнению с контролем. При добавлении в среду НЧ CuO (1000 мкг/л) средний объем клеток *Th. weissflogii* также достоверно увеличивался по сравнению с контролем в 1.7 раза – до $1465 \pm 187 \text{ мкм}^3$ (непарный *t*-тест, $P < 0.05$).

Влияние ионов меди и наночастиц оксида меди на физиолого-биохимические и флуоресцентные показатели Th. weissflogii

Внесение в культуральную среду меди оказывало влияние на физиолого-биохимические показатели клеток *Th. weissflogii* (табл. 1, 2). При концентрациях поллютантов, временно или необратимо ингибирующих рост водорослей, отмечено снижение содержания хлорофилла *a*, значений автофлуоресценции отдельных клеток в красной области спектра FL4, а также выхода флуоресценции на единицу хлорофилла ($F_m/\text{Хл}$). Уменьшение значений отношения $F_m/\text{Хл}$ под воздействием токсикантов указывает на снижение функциональной активности хлорофилла, что, вероятно, связано с эффектом самозатенения молекул пигмента при увеличении размеров клеток и соответствующим снижением удельного коэффициента поглощения световых квантов [31]. В литературе также высказывается предположение, что снижение выхода флуоресценции может быть связано с заменой ионов магния на ионы меди в перрольном кольце молекулы хлорофилла и инактивацией пигмента как переносчика энергии световых квантов [32].

При повышении концентрации Cu^{2+} и НЧ CuO в среде отмечено снижение метаболической активности клеток *Th. weissflogii*, измеренной с помощью флуорохромного красителя FDA (табл. 1, 2). Максимальные значения FDA флуоресценции 120–140 наблюдались у водорослей, культивируе-

мых без добавления меди. При внесении в среду меди как в ионной, так и в наноформе у *Th. weissflogii* отмечено уменьшение значений FDA флуоресценции, указывающее на снижение жизнеспособности водорослей, вплоть до 40–50 при летальных или близких к ним концентрациях поллютантов. Повышение концентрации Cu^{2+} и НЧ CuO в среде сопровождалось увеличением продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках водорослей, что, как известно, инициирует интенсивный окислительный стресс, приводящий к разрушению клеток и их гибели. Следует отметить, что существенных различий между действием ионов и наночастиц меди на данные параметры нами не выявлено.

Отдельно хотелось бы акцентировать внимание на особенностях влияния ионов и наночастиц оксида меди на эффективность работы фотосинтетического аппарата *Th. weissflogii*. Результаты показали, что параметр F_v/F_m , характеризующий квантовую эффективность утилизации световой энергии фотосинтетическим комплексом ФС II, сохранял высокие значения в тех условиях, где действие меди хоть и оказывало влияние на рост водорослей, но клетки сохраняли жизнеспособность (рис. 4). При концентрации ионов меди 150 мкг/л показатель F_v/F_m быстро снижался, тогда как при добавлении наночастиц оксида меди в концентрации 2000 мкг/л отмечено незначительное падение коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла в первые четверо суток эксперимента, затем он снижался до значений 0.45–0.5, что также является нетипичным для культуры, находящейся на стадии элиминации, и свидетельствует о слабом или опосредованном воздействии CuO НЧ на этот показатель. Как видно из графиков, влияние меди в большей степени сказывается на максимальной величине относительной скорости электронного транспорта (нормированной на единицу хлорофилла). Изменения параметра $gETR^*$, вызванные добавлением поллютантов в культуральную среду, в данном случае согласуется с изменениями в скоростях роста водорослей. На рисунке 5 представлены корреляционные зависимости, подтверждающие данный тезис. При концентрациях меди в двух ее формах, где наблюдаются положительные значения скорости роста водорослей, коэффициенты детерминации связи скорости роста и рассматриваемых флуоресцентных величин достаточно высоки, но при очень низких коэффициентах линейной регрессии. Проверка этих коэффициентов по критерию *t*-Стьюдента показала статистическую достоверность при уровне значимости $P \leq 0.1$, а их двукратное различие показывает более сильную связь $gETR^*$ со скоростью роста водорослей по сравнению с показателем F_v/F_m .

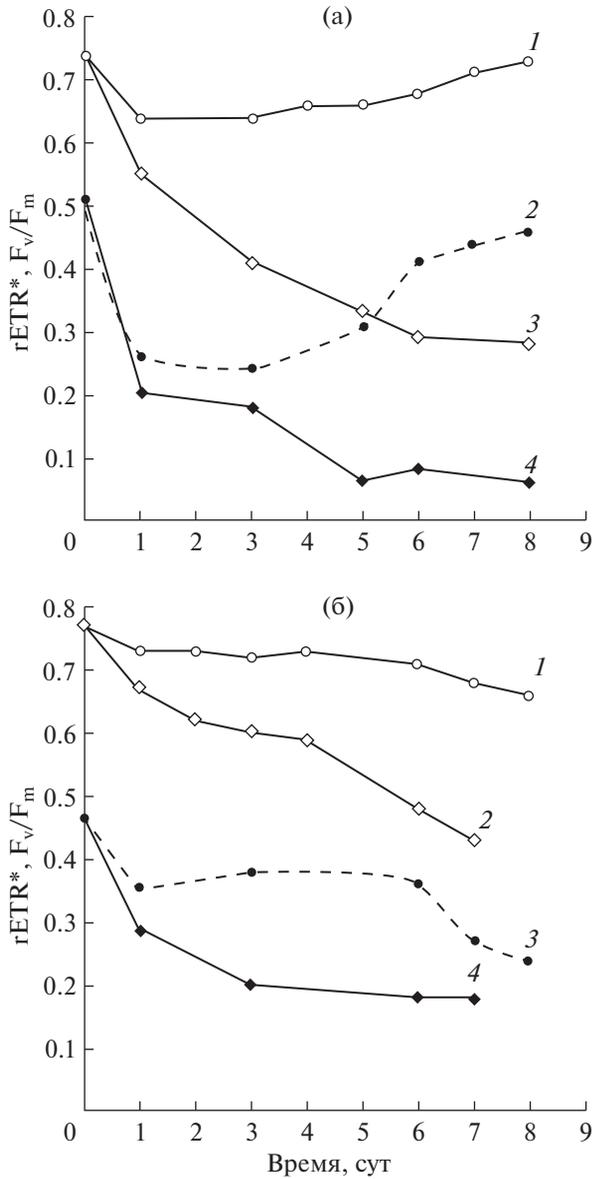


Рис. 4. Динамика изменения квантовой эффективности ФС II при открытых (F_v/F_m , 1, 2 для а и б) и закрытых реакционных центрах ($rETR^*$, 3, 4 для а и б) у *Thalassiosira weissflogii* при добавлении в культуральную среду ионов меди в концентрации 75 (1, 3) и 150 (2, 4) мкг/л (а) и наночастиц оксида меди в концентрации 1000 (1, 3) и 2000 мкг/л (2, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали, что характер воздействия меди в ионной форме и в форме наноксида на клетки *Th. weissflogii* имеет как схожие черты, так и существенные различия. Во всех вариантах эксперимента увеличение концентрации поллютантов в культуральной среде приводило к снижению удельной скорости роста водорослей и конечной плотности культуры. Однако воздействие ионов меди вызывало у водо-

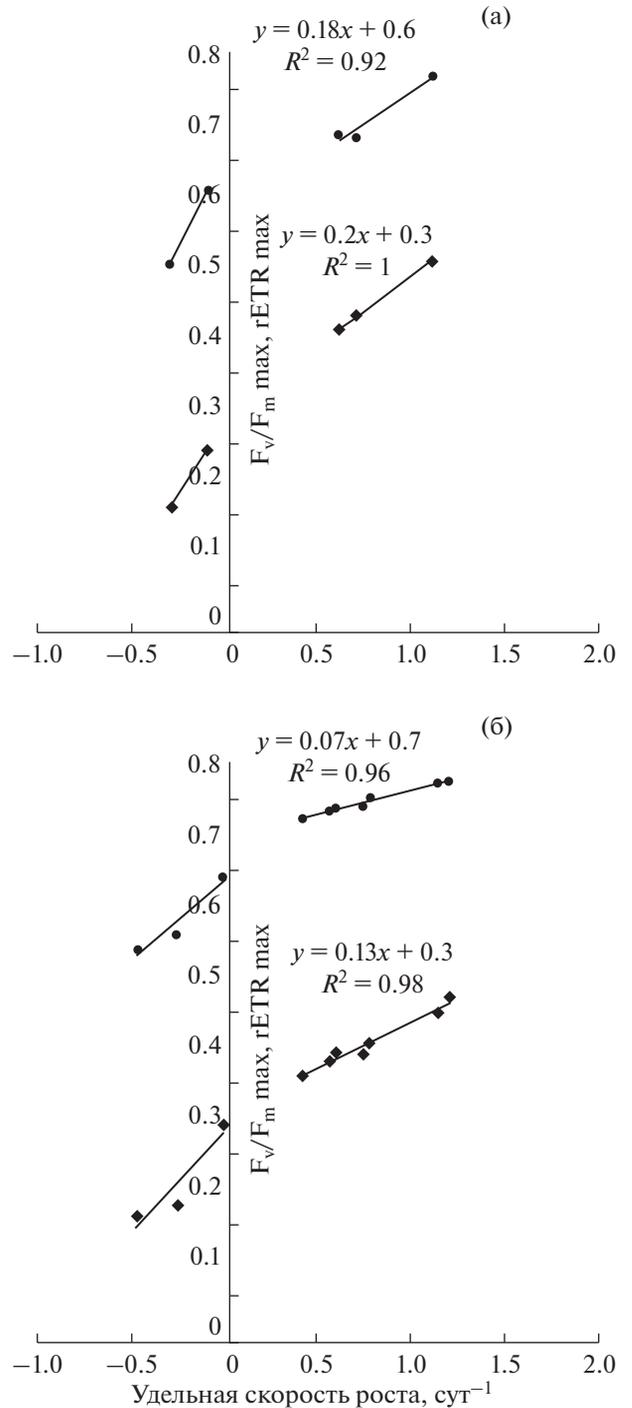


Рис. 5. Взаимосвязь изменений скорости роста *Thalassiosira weissflogii* и соответствующих значений $rETR^*$ и F_v/F_m при воздействии наночастиц оксида меди (а) и ионов меди (б).

рослей длительную лаг-фазу, тогда как при добавлении наночастиц оксида меди данного эффекта не наблюдалось, и начальный рост исследуемой культуры аппроксимировался по экспоненциальной зависимости. Мы полагаем, что торможение роста водорослей на начальном этапе эксперимента

при концентрациях Cu^{2+} в среде 37.5 и 75 мкг/л вызвано цитотоксическим действием ионов меди. Восстановление роста *Th. weissflogii* на 3–6 сут эксперимента, вероятно, является следствием внутри- и внеклеточных процессов детоксикации меди и снижения концентрации меди в активной форме в среде. В свою очередь, при культивировании водорослей в среде с добавлением наночастиц, концентрация Cu^{2+} в воде мала. Так, по оценкам разных авторов [22, 23], процент высвобождаемых ионов меди из НЧ CuO составляет порядка 2–10%. Поэтому отсутствие лаг-фазы у водорослей, выращиваемых в среде с наночастицами, очевидно, связано с низкой концентрацией Cu^{2+} в среде. Наблюдаемое же снижение скорости роста *Th. weissflogii* при увеличении содержания НЧ CuO в среде может быть обусловлено механическим повреждением мембран клеток, адсорбцией отдельных НЧ и их агрегатов на поверхности клеточной стенки водорослей, что нарушает ее проницаемость и дыхательную функцию, а также интернализацией металлических наночастиц внутрь клеток [20–23]. В целом полученный результат показывает, что оценка токсического действия поллютанта на микроводоросли в краткосрочных экспериментах длительностью от нескольких минут до нескольких суток не всегда дает достоверные результаты. Кроме того, такой подход не позволяет выявить долгосрочные изменения численности популяции, особенно при воздействии сублетальных концентраций токсиканта [33]. Прогнозировать состояние биологических процессов в водоемах и распознавать скрытое токсическое воздействие среды позволяют более долгосрочные эксперименты, которые служат для определения хронической токсичности [34].

Медь как в ионной форме, так и в форме наноксидов приводила к увеличению объемов клеток *Th. weissflogii* и изменению их формы и гранулярности. При этом сигнал SS, характеризующий гранулярность, был значительно выше у клеток *Th. weissflogii*, подвергшихся воздействию наночастиц. Аналогичные результаты получены с другими видами водорослей [18, 20]. При добавлении в культуральную среду 5 мг/л НЧ TiO_2 у *Nitzschia closterium* обнаружено значительное повышение интенсивности бокового рассеяния (SS) по сравнению с контролем [35]. Авторы предполагают, что такое выраженное увеличение интенсивности SS может указывать на поглощение/интернализацию НЧ TiO_2 водорослями. Изображения клеток *Th. weissflogii*, полученные нами с применением световой и сканирующей электронной микроскопии, позволили установить, что повышение значений SS является следствием значительной деформации и перфорации плазмалеммы, а также адсорбции отдельных агрегатов наночастиц на поверхности клеток (энергодисперсионная рент-

геновская спектроскопия элементного состава данных агрегатов подтвердила наличие меди в их составе).

Интернализация наночастиц внутрь клеток является одним из возможных механизмов их влияния на микроводоросли. *Th. weissflogii* как представитель диатомовых водорослей характеризуется наличием плотного кремниевого панциря [36], что, по мнению ряда авторов [18, 20, 37], может служить “защитным барьером” от проникновения НЧ внутрь клетки. В то же время, с использованием атомно-силовой микроскопии показано, что НЧ Ag проникают сквозь поры панциря диатомей *Cylindrotheca fusiformis* и *C. closterium*, вызывая локальное механическое повреждение внутриклеточных органелл без нарушения целостности клеточной стенки [38]. К сожалению, результаты нашего исследования не позволяют подтвердить или опровергнуть интернализацию наночастиц CuO в клетки *Th. weissflogii*. Рост продукции АФК и снижение метаболической активности водорослей, наблюдаемые нами в эксперименте, могут быть обусловлены как проникновением НЧ внутрь клеток водорослей, так и высвобождением ионов меди из металла и их токсическим действием на клетку. Отметим, что развитие окислительного стресса (увеличение производства АФК) и подавление ферментативной активности водорослей являются первыми сигнальными маркерами ингибирующего воздействия поллютанта на клетку, что позволяет использовать их в качестве индикаторов стрессового воздействия.

Ионы меди и наночастицы оксида меди по-разному влияли на эффективность работы фотосинтетического аппарата исследуемой культуры водорослей. При высоких концентрациях Cu^{2+} в среде показатель F_v/F_m у микроводорослей быстро снижался (до 0.29 при $\text{Cu}^{2+} = 150$ мкг/л). При этом при концентрации НЧ, полностью ингибирующей рост *Th. weissflogii*, данный показатель сохранял значения 0.45–0.5, что является нетипичным для культуры, находящейся на стадии элиминации, и свидетельствует о слабом или опосредованном воздействии НЧ CuO на эффективность работы ФС II. Влияние Cu^{2+} также в большей степени сказывалось на величине максимальной относительной скорости электронного транспорта гЕТР* (нормированной на единицу хлорофилла). Изменения параметра гЕТР*, вызванные добавлением поллютантов в культуральную среду, в данном случае согласуются с изменениями в скорости роста водорослей. Вероятно, это можно объяснить тем, что ионы меди индуцируют производство пероксида водорода H_2O_2 , который разрушает хлоропласты. Отсутствие изменений параметра F_v/F_m в клетках при воздействии наночастиц оксида меди может объясняться физиологической адаптацией растений, препятству-

ющей развитию окислительного стресса, вызванного воздействием исследуемого поллютанта [39]. К тому же ионы меди, выделяемые из наночастиц оксида меди и составляющие 2–10%, могут действовать как кофактор на различные жизненно важные метаболические процессы, например, фотосинтез, дыхание и усвоение азота, как это показано в работе [40]. Вероятно, по этой причине мы не регистрируем значительного снижения эффективности работы фотосинтетического аппарата водорослей. Аналогичные данные представлены и в ряде других исследований с микроводорослями [41, 42]. Полученные результаты не позволяют считать параметр F_v/F_m корректным индикатором физиологического состояния водорослей в условиях загрязнения медью. Однако он может применяться для скрининга ингибиторов фотосинтеза [43].

ВЫВОДЫ

1. По результатам экспериментального исследования установлены основные закономерности изменения морфологических, структурно-функциональных и флуоресцентных показателей диатомовой микроводоросли *Th. weissflogii* при добавлении в среду наночастиц оксида меди и ионов меди разной концентрации. Показано, что медь в ионной форме более токсична для *Th. weissflogii*, чем в виде наноксида.

2. Показан различный характер действия используемых токсикантов на рост водорослей и работу фотосинтетического аппарата *Th. weissflogii* в условиях длительного культивирования. При внесении в культивационную среду ионов меди у водорослей отмечена длительная лаг-фаза кривой роста, тогда как при добавлении наночастиц оксида меди данного эффекта не наблюдалось. При концентрации ионов меди, приводящей к необратимой деградации исследуемой культуры водорослей, показатели гЕТР и F_v/F_m быстро снижались, в то время как сублетальные концентрации наночастиц оксида меди слабо влияли на эффективность работы фотосинтетического аппарата *Th. weissflogii*.

3. Выявлено схожее действие меди в ионной и наноформе на морфологию клеток водорослей, продукцию активных форм кислорода, активность внутриклеточных эстераз и автофлуоресценцию клеток *Th. weissflogii*. Медь в различных ее формах приводила к увеличению объема клеток, изменению их формы и гранулярности. С ростом концентрации исследуемых поллютантов в культуральной среде отмечено увеличение продукции активных форм кислорода, подавление ферментативной активности водорослей и снижение значений автофлуоресценции отдельных клеток в красной области спектра.

Авторы выражают глубокую признательность сотруднику отдела экологической физиологии водорослей Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” О.С. Алатарцевой за предоставленную культуру *Thalassiosira weissflogii* и руководителю лаборатории микроскопии В.Н. Лишаеву за помощь в работе с электронным микроскопом.

Работа выполнена в рамках тем государственного задания Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” № 121041400077-1 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” и № 121030300149-0 “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса”.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Macfie S.M., Tarmohamed Y., Welbourn P.M. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1994. V. 27. P. 454. <https://doi.org/10.1007/BF00214835>
2. Echeveste P., Croot P., von Dassow P. Differences in the sensitivity to Cu and ligand production of coastal vs offshore strains of *Emiliania huxleyi* // Sci. Total Environ. 2018. V. 625. P. 1673. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.050>
3. Nielsen E.S., Wiium-Andersen S. Copper ions as poison in the sea and in freshwater // Mar. Biol. 1970. V. 6. P. 93. <https://doi.org/10.1007/BF00347237>
4. Pistocchi R., Guerrini F., Balboni V., Boni L. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium sp.* // Eur. J. Psychol. 1997. V. 32. P. 125. <https://doi.org/10.1080/09670269710001737049>
5. Cid A., Herrero C., Torres E., Abalde J. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum*: effects on photosynthesis and related parameters // Aquat. Toxicol. 1995. V. 31. P. 165. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00071-W](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00071-W)
6. Perales-Vela H.V., González-Moreno S., Montes-Horcasitas C., Cañizares-Villanueva R.O. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) // Chemosphere. 2007. V. 67. P. 2274. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.036>

7. Lage O.M., Parente A.M., Soares H.M.V.M., Vasconcelos M.T.S.D., Salema R. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture // Eur. J. Psychol. 1994. V. 29. P. 253.
<https://doi.org/10.1080/09670269400650711>
8. Miazek K., Iwanek W., Remacle C., Richel A., Goffin D. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: a review // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 23929.
<https://doi.org/10.3390/ijms161023929>
9. Leal P.P., Hurd C.L., Sander S.G., Armstrong E., Roleda M. Copper ecotoxicology of marine algae: a methodological appraisal // Chem. Ecol. 2016. V. 32. P. 786.
<https://doi.org/10.1080/02757540.2016.1177520>
10. di Toppi L.S., Pawlik-Skowrońska B., Vurro E., Vattuone Z., Kalinowska R., Restivo F.M., Musetti R., Skowroński T. First and second line mechanisms of cadmium detoxification in the lichen photobiont *Trebouxia impressa* (Chlorophyta) // Environ. Pollut. 2008. V. 151. P. 280.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.010>
11. Bundschuh M., Filser J., Lüderwald S., McKee M.S., Metreveli G., Schaumann G.E., Schulz R., Wagner S. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? // Environ. Sci. Eur. 2018. V. 30. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>
12. Dumont E.R., Elger A., Azéma C., Miche H.C., Surble S., Larue C. Cutting-edge spectroscopy techniques highlight toxicity mechanisms of copper oxide nanoparticles in the aquatic plant *Myriophyllum spicatum* // Sci. Total Environ. 2022. V. 803. P. 150001.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150001>
13. Keller A.A., McFerran S., Lazareva A., Suh S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials // J. Nanopart. Res. 2013. V. 15. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
14. Ivask A., Juganson K., Bondarenko O., Mortimer M., Aruoja V., Kasemets K., Blinova I., Heinlaan M., Slaveykova V., Kahru A. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells *in vitro*: a comparative review // Nanotoxicology. 2014. V. 8. P. 57.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2013.855831>
15. Xiong T.T., Dumat C., Dappe V., Vezin H., Schreck E., Shahid M., Pierart A., Sobanska S. Copper oxide nanoparticle foliar uptake, phytotoxicity, and consequences for sustainable urban agriculture // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. P. 5242.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05546>
16. Adeleye A.S., Conway J.R., Garner K., Huang Y., Su Y., Keller A.A. Engineered nanomaterials for water treatment and remediation: costs, benefits, and applicability // Chem. Eng. J. 2016. V. 286. P. 640.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.105>
17. Lee W.M., An Y.J. Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: no evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation // Chemosphere. 2013. V. 91. P. 536.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.033>
18. Saison C., Perreault F., Daigle J.C., Fortin C., Clavier J., Morin M., Popovic R. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* // Aquat. Toxicol. 2010. V. 96. P. 109.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.002>
19. Wang Y., Zhu X., Lao Y., Lv X., Tao Y., Huang B., Wang J., Zhou J., Cai Z. TiO₂ nanoparticles in the marine environment: physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricorutum* // Sci. Total. Environ. 2016. V. 565. P. 818.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.164>
20. Oukarroum A., Halimi I., Siaj M. Cellular Responses of *Chlorococcum* sp. algae exposed to zinc oxide nanoparticles by using flow cytometry // Water Air Soil Pollut. 2019. V. 230. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s11270-018-4051-3>
21. Sendra M., Moreno-Garrido I., Blasco J., Araujo C.V. Effect of erythromycin and modulating effect of CeO₂ NPs on the toxicity exerted by the antibiotic on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricorutum* // Environ. Pollut. 2018. V. 242. P. 357.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.009>
22. Wan J.K., Chu W.L., Kok Y.Y., Cheong K.W. Assessing the toxicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate in a tropical *Chlorella* // J. Appl. Phycol. 2018. V. 30. P. 3153.
<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1408-3>
23. Huang W., Zhou Y., Zhao T., Tan L., Wang J. The effects of copper ions and copper nanomaterials on the output of amino acids from marine microalgae // Environ. Sci. Pollut. Res. 2022. V. 29. P. 9780.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-16347-3>
24. Соломонова Е., Муханов В. Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Phaeodactylum tricorutum* и *Nitzschia* sp. с помощью проточной цитометрии // Морской экологический журнал. 2011. Т. 10. С. 67.
25. Wang H., Joseph J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader // Free Radical Biol. Med. 1999. V. 27. P. 612.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0)
26. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Погосян С.И. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла: учеб.-метод. пособие. М.: Макс Пресс, 2010. 116 с.
27. Jeffrey R.F.C., Mantoura S.W. Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods // Monograph on Oceanographic Methodology / Eds. S.W. Wright et al. Paris. UNESCO Publishing. 1997. P. 661.
28. Брянцева Ю.В., Лях А.М., Сергеева А.В. Расчет объемов и площадей поверхности одноклеточных водорослей Черного моря. Севастополь: НАН Украины Институт биологии южных морей, 2005. 25 с.
29. Galletti A., Seo S., Joo S.H., Su C., Blackwelder P. Effects of titanium dioxide nanoparticles derived from consumer products on the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. P. 21113.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7556-6>
30. Adeleye A.S., Keller A.A. Interactions between algal extracellular polymeric substances and commercial TiO₂

- nanoparticles in aqueous media // *Environ. Sci. Technol.* 2016. V. 50. P. 12258.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03684>
31. Flynn K.J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interactions in phytoplankton // *J. Plankton Res.* 2001. V. 23. P. 977.
<https://doi.org/10.1093/plankt/23.9.977>
32. Gao G., Liu Y., Li X., Feng Z., Xu Z., Wu H., Xu J. Expected CO₂-induced ocean acidification modulates copper toxicity in the green tide alga *Ulva prolifera* // *Envir. Exper. Bot.* 2017. V. 135. P. 63.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.12.007>
33. Дмитриева А.Г., Даллакян Г.А., Лысенко Н.Л. Анализ функциональных показателей популяции водорослей в условиях накопления меди // *Альгология.* 1992. Т. 2. № 2. С. 30.
34. Koppel D.J., Adams M.S., King C.K., Jolley D.F. Chronic toxicity of an environmentally relevant and equitoxic ratio of five metals to two Antarctic marine microalgae shows complex mixture interactivity // *Environ. Pollut.* 2018. V. 242. P. 1319.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.110>
35. Xia B., Chen B., Sun X., Qu K., Ma F., Du M. Interaction of TiO₂ nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia closterium*: growth inhibition, oxidative stress and internalization // *Sci. Total Environ.* 2015. V. 508. P. 525.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.066>
36. Franzitta M., Feijão E., Cabrira M.T., Gameiro C., Matos A.R., Marques J.C., Johannes W., Reis-Santos P., Fonseca V., Pretti C., Caçador I., Duarte B. Toxicity going nano: ionic versus engineered Cu nanoparticles impacts on the physiological fitness of the model diatom *Phaeodactylum tricornerutum* // *Front. Mar. Sci.* 2020. V. 7. P. 1154.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2020.539827>
37. Tang Y., Xin H., Yang F., Long X. A historical review and bibliometric analysis of nanoparticles toxicity on algae // *J. Nanopart. Res.* 2018. V. 20. P. 1. doi.org/
<https://doi.org/10.1007/s11051-018-4196-4>
38. Pletikapić G., Žutić V., VinkovićVrček I., Svetličić V. Atomic force microscopy characterization of silver nanoparticles interactions with marine diatom cells and extracellular polymeric substance // *J. Mol. Recognit.* 2012. V. 2. P. 309. doi.org/
<https://doi.org/10.1002/jmr.2177>
39. Shaw A.K., Ghosh S., Kalaji H.M., Bosa K., Brestic M., Zivcak M., Hossain Z. Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defense and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Envir. Exper. Bot.* 2014. V. 102. P. 37.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.02.016>
40. Mahawar H., Prasanna R., Singh S.B., Nain L. Influence of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles on the cyanobacterium *Calothrix elenkinii* // *Bio-NanoScience.* 2018. V. 8. P. 802.
<https://doi.org/10.1007/s12668-018-0543-2>
41. Marchello A.E., Barreto D.M., Lombardi A.T. Effects of titanium dioxide nanoparticles in different metabolic pathways in the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) // *Water, Air, Soil Pollut.* 2018. V. 229. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s11270-018-3705-5>
42. Wu D., Zhang J., Du W., Yin Y., Guo H. Toxicity mechanism of cerium oxide nanoparticles on cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and their ecological risks // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022. V. 29. P. 34010.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-18090-1>
43. Fai P.B., Grant A., Reid B. Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment // *Environ. Toxicol. Chem.* 2007. V. 26. P. 1520.
<https://doi.org/10.1897/06-394R1.1>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА ЦИНКА НА АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У РАСТЕНИЙ *Brassica juncea* L. (CZERN.) И *Sinapis alba* L.

© 2023 г. И. А. Нилова^а, *, Н. С. Репкина^а, Н. М. Казнина^а

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

*e-mail: im-ira@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 14.03.2023 г.

В условиях вегетационного опыта изучали влияние цинка в концентрациях 5 (контроль), 50, 100 и 150 мг/кг субстрата на рост, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность компонентов антиоксидантной системы у растений *Brassica juncea* L. (Czern.) сорт Славянка и *Sinapis alba* L. сорт Бельгия. Обнаружены некоторые различия и сходства в ответной реакции АОС изученных видов на избыток цинка в корнеобитаемой среде. Так, у *B. juncea* при воздействии цинка в высоких концентрациях изменений интенсивности ПОЛ не происходило, несмотря на высокое содержание металла в корнях и побегах. Вместе с тем уже в присутствии металла в концентрации 50 мг/кг субстрата наблюдалось увеличение активности гваяколовой пероксидазы (ГвПО) и каталазы. У *S. alba* при высоких концентрациях цинка в субстрате содержание металла в побегах оказалось выше, чем у *B. juncea*. При этом, заметно возрастало содержание малонового диальдегида, несмотря на усиление активности супероксиддисмутазы и ГвПО. У обоих изученных видов растений увеличение концентрации цинка в субстрате до 50 мг/кг и выше приводило к повышению уровня пролина, тогда как содержание каротиноидов снижалось. Учитывая, что в изученных концентрациях металл оказывал менее сильное негативное воздействие на рост побега у *B. juncea* по сравнению с *S. alba*, сделан вывод о большей устойчивости растений этого вида к избытку цинка в корнеобитаемой среде.

Ключевые слова: горчица белая, горчица сарептская, антиоксидантные ферменты, окислительный стресс, пролин, цинк

DOI: 10.31857/S0015330323600183, EDN: WWNQPF

ВВЕДЕНИЕ

Представители семейства *Brassicaceae* в целом характеризуются довольно высокой устойчивостью к тяжелым металлам, в том числе к цинку [1–3]. Более того, некоторые из них рекомендованы для использования в фиторемедиации загрязненных цинком территорий. Среди них в большей степени изучена горчица сарептская (*Brassica juncea*, род *Brassica*), которая, судя по литературным данным, не только хорошо адаптируется к загрязнению почвы цинком, но и накапливает металл в больших количествах в надземных органах [3–5]. Ряд авторов относят этот вид к гипераккумуляторам этого металла [3, 5]. Механизмы устойчивости растений *B. juncea* к высоким концентрациям цинка в окружающей среде активно изучаются. В частности, обнаружено, что при высоких концентрациях этого металла у *B. juncea* усиливается активность некоторых транспортных белков, в том числе, транспортирующих ионы цинка в вакуоль,

белков-дегидринов [6], которые повышают металлоустойчивость растений за счет снижения интенсивности перекисного окисления липидов и защиты клеточных мембран [7] и возрастает содержание низкомолекулярных соединений [8]. Помимо этого выявлена важная роль антиоксидантной системы в адаптации растений этого вида к избытку цинка в корнеобитаемой среде [8–10].

В роде *Sinapis*, который филогенетически тесно связан с родом *Brassica* [11], также присутствуют виды, способные расти на загрязненных цинком почвах, в частности, горчица белая (*Sinapis alba*). Более того, растения этого вида могут накапливать металл в довольно больших количествах, хотя и не относятся к гипераккумуляторам, как *B. juncea* [12–14]. Вследствие этого, а также учитывая большую биомассу горчицы белой, в последнее время повысился интерес к ней как к перспективной для фиторемедиации культуре. К настоящему времени выявлены даже некоторые механизмы

устойчивости *S. alba* к высоким концентрациям цинка. Так, показано, что растения этого вида имеют высокий уровень экспрессии генов, кодирующих металлотионеины [15] и транспортные белки [16], что, вероятно, способствует их успешному росту в условиях повышения содержания этого металла в почве. Однако в целом устойчивость *S. alba* к тяжелым металлам изучена в гораздо меньшей степени, чем *B. juncea*.

Известно, что одним из важных механизмов устойчивости растений к стресс-факторам различной природы является активизация компонентов антиоксидантной системы, направленная на снижение количества активных форм кислорода и предотвращение развития окислительного стресса. При избытке цинка в окружающей среде у растений, как правило, повышается активность ряда антиоксидантных ферментов, в том числе, супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), аскорбатпероксидазы (АПО), гваяколяпероксидазы, глутатионредуктазы и увеличивается количество неферментных антиоксидантов, таких, например, как пролин, аскорбат, глутатион и др. [5, 17]. Что касается вклада антиоксидантной системы в устойчивость растений семейства *Brassicaceae* к высокому содержанию цинка, данных относительно немного, и они носят противоречивый характер. Например, у *B. napus* при воздействии цинка в концентрациях 50, 150 и 300 мкМ активность СОД возрастала [10], тогда как у этого же вида при схожих концентрациях этого металла (70, 140 и 280 мкМ) она не изменялась [18]. Активность КАТ у *B. rapa* и *B. chinensis* при использовании цинка в концентрации 200 мкМ возрастала [19, 20], а у *B. napus* сохранялась неизменной даже при более высокой концентрации металла (280 мкМ) [18].

Учитывая, что реакции разных видов растений семейства *Brassicaceae* на повышение концентрации цинка различны [10, 21], целью настоящего исследования было сравнительное изучение влияния избытка этого металла в корнеобитаемой среде на активность компонентов антиоксидантной системы у растений *B. juncea* и *S. alba*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на растениях горчицы сарептской (*Brassica juncea* L. (Czern.)) сорта Славянка и горчицы белой (*Sinapis alba* L.) сорта Бельгия. Семена были предоставлены Отделом генетических ресурсов масличных и прядильных культур Федерального исследовательского центра “Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова”.

Растения выращивали в условиях вегетационного опыта в сосудах с песком объемом 0.8 л. Плотность посева составляла 10 растений на сосуд. В опыте использовали промытый водой и

прокаленный песок. Цинк в субстрат добавляли перед началом опыта в виде его сернокислой соли ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) в концентрации 5 (контроль), 50, 100 или 150 мг/кг субстрата. Полив осуществляли питательным раствором Хогланда-Арнона (1/2 концентрации), не содержащим ионы цинка.

О влиянии избытка цинка на растения судили спустя 21 сут от посева по изменению (по отношению к контролю) показателей роста побега (высота, сырая и сухая биомасса), интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), активности ключевых антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ и ГвПО) и содержанию неферментных антиоксидантов (пролин, каротиноиды). Помимо этого, определяли содержание цинка в побегах растений.

Для измерения ростовых показателей использовали общепринятые методы. Интенсивность ПОЛ в листьях оценивали по накоплению МДА, содержание которого определяли по его способности реагировать с тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный комплекс [22]. Оптическую плотность измеряли при 532 и 600 нм.

Для определения активности антиоксидантных ферментов навеску листьев 0.4 г гомогенизировали в 2 мл буфера (pH 7.5), который включал: НЕРЕС (50 мМ), $MgCl_2$ (5 мМ), ЭДТА (0.4 мМ), ДТТ (3 мМ), PMSF (1 мМ), PVP (1%), глицерол (10%), после чего гомогенат центрифугировали 20 мин при 4°C и 14000 g. Активность СОД определяли методом, основанным на способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинового тетразолия [23], с модификацией [24]. Оптическую плотность измеряли при 560 нм. Активность КАТ определяли по ферментативному разложению пероксида водорода при 240 нм [24, 25]. Динамику изменения оптической плотности наблюдали в течение 5 мин, когда зависимость активности КАТ от времени была линейная. Об активности гваякол-специфичной пероксидазы (ГвПО) судили по увеличению оптической плотности при 470 нм в результате окисления гваякола до тетрагваякола в присутствии пероксида водорода [24, 26]. Содержание белка определяли по методу Бредфорда [27], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Содержание пролина определяли методом Бейтса с соавт, основанного на реакции пролина с нингидрином с образованием окрашенного комплексного соединения [28]. Каротиноиды экстрагировали 80% ацетоном, их содержание рассчитывали по формулам D. Wettstein [29].

Содержание МДА, пролина и каротиноидов и активность антиоксидантных ферментов определяли на спектрофотометре СФ-2000 (“Спектр”, Россия).

Анализ содержания цинка в побегах растений проводился масс-спектрометрическим методом с

Таблица 1. Показатели роста побега у *B. juncea* и *S. alba* при разных концентрациях цинка в субстрате

Вид	Концентрация цинка в субстрате, мг/кг	Высота побега, см	Сырая биомасса, г	Сухая биомасса, г
<i>Brassica juncea</i>	5	23.63 ± 1.09b	1.28 ± 1.09a	0.13 ± 0.01a
	50	17.75 ± 0.71c	1.09 ± 0.12a	0.09 ± 0.01bc
	100	12.32 ± 0.85d	0.67 ± 0.10b	0.07 ± 0.01c
	150	8.61 ± 0.55e	0.39 ± 0.05b	0.04 ± 0.01d
<i>Sinapis alba</i>	5	26.22 ± 1.84a	1.27 ± 0.14a	0.11 ± 0.01ab
	50	23.49 ± 0.14b	1.36 ± 0.15a	0.11 ± 0.001ab
	100	11.66 ± 0.51d	0.46 ± 0.04b	0.05 ± 0.004dc
	150	6.94 ± 0.48f	0.27 ± 0.03c	0.03 ± 0.003d

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

Таблица 2. Содержание цинка (мг/кг) в побегах *B. juncea* и *S. alba* при разных его концентрациях в субстрате

Вид	Концентрация цинка в субстрате, мг/кг			
	5	50	100	150
<i>Brassica juncea</i>	77.48 ± 10.78	1450.23 ± 121.62	1849.71 ± 153.58	2239.21 ± 184.74
<i>Sinapis alba</i>	187.32 ± 20.60	2505.31 ± 206.02	2620.35 ± 215.22	3118.53 ± 311.08
<i>LSD</i> _{0,05}	25.96	133.06	252.06	371.04

Примечание. Различия между значениями достоверны при $P < 0.05$.

использованием ICP-MS (“Aligent”, США) с предварительным разложением образцов в растворе кислот $\text{HNO}_3 : \text{HCl}$ (4 : 1) в системе микроволнового разложения Berghof Speedwave Xpert Microwave Digestion System. Представленные в табл. 2 значения являются результатом анализа смешанной пробы ($n = 27$). Погрешность измерений ($\pm \Delta$) рассчитывали по формулам согласно сертифицированной методике [30].

Повторность в пределах одного варианта опыта 3–6 кратная, опыт повторяли не менее 3 раз. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения (ростовые показатели и содержание МДА) статистическую значимость между средними значениями устанавливали с помощью критерия Стьюдента. Достоверность различий между вариантами опыта по содержанию цинка в побегах растений выявляли с использованием метода наименьших квадратов ($\text{LSD}_{0,05}$). Когда распределение отличалось от нормального (активность ферментов) использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Данные на графиках и в таблицах представлены в виде средних арифметических значений и их стандартных ошибок (при $P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования показали, что у растений *B. juncea* торможение роста побега наблюдалось уже при концентрации цинка 50 мг/кг субстра-

та. Дальнейшее повышение концентрации металла вызывало более сильный ингибирующий эффект на высоту побега и накопление биомассы. У *S. alba* рост побега замедлялся при использовании цинка в более высоких концентрациях (100 и 150 мг/кг субстрата) (табл. 1). Однако при наибольшей концентрации металла (150 мг/кг субстрата) у *S. alba* высота побега и сырая биомасса оказались более, чем в 3.5 и 4.5 раза, соответственно, меньше, чем в контроле, тогда как у *B. juncea* – менее, чем в 3 раза.

Как известно, ответная реакция растений на избыток цинка во многом зависит от его содержания в органах. В наших исследованиях содержание цинка в побегах обоих видов возрастало с увеличением концентрации металла в субстрате. При этом в побегах *S. alba* оно оказалось выше, чем у *B. juncea*, в том числе и при оптимальной концентрации металла в субстрате (5 мг/кг) (табл. 2).

Несмотря на высокие концентрации цинка в надземных органах, увеличения интенсивности ПОЛ у *B. juncea* не наблюдалось, о чем свидетельствует отсутствие изменений в содержании МДА даже при наиболее высокой концентрации металла. В отличие от этого у *S. alba* отмечено накопление МДА при 100 и 150 мг/кг цинка в субстрате (табл. 3), показывающее усиление интенсивности ПОЛ и развитие окислительного стресса.

Отсутствие изменений окислительно-восстановительного баланса клеток в стрессовых условиях может свидетельствовать об устойчивости растений к данному стрессору и/или об эффек-

Таблица 3. Содержание МДА (нмоль/г сырого веса) в листьях растений *B. juncea* и *S. alba* при разных концентрациях цинка в субстрате

Вид	Концентрация цинка в субстрате, мг/кг			
	5	50	100	150
<i>Brassica juncea</i>	2.04 ± 0.16a	1.93 ± 0.17a	2.55 ± 0.37a	2.04 ± 0.18a
<i>Sinapis alba</i>	1.98 ± 0.09b	2.10 ± 0.08b	2.77 ± 0.15a	2.67 ± 0.19a

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними значениями в пределах каждого вида при $P < 0.05$.

тивной работе компонентов антиоксидантной системы растений. Изучение активности антиоксидантных ферментов у двух представителей семейства *Brassicaceae* выявило, что ее изменение в значительной степени зависит от вида растений. Так, в условиях цинкового стресса активность СОД у растений *B. juncea* не изменялась (по сравнению с контролем) ни при одной из изученных концентраций металла (рис. 1а). В отличие от этого, у растений *S. alba* она возрастала (на 34% по сравнению с контролем) уже в присутствии металла в концентрации 50 мг/кг субстрата и при дальнейшем усилении стрессовой нагрузки сохранялась на этом же уровне.

Активность КАТ у растений *B. juncea* повышалась в присутствии цинка в концентрациях 50 и 100 мг/кг субстрата (на 28 и 14% по сравнению с контролем соответственно), однако дальнейшее увеличение концентрации (до 150 мг/кг субстрата) вызывало резкое снижение этого показателя. У растений *S. alba* независимо от концентрации металла в субстрате увеличения активности фермента не происходило (рис. 1б).

Активность ГвПО у обоих видов растений возрастала (по сравнению с контролем) уже в присутствии цинка в концентрации 50 мг/кг субстрата. При этом у *B. juncea* она повышалась в 1.5 раза по сравнению с контролем и при дальнейшем увеличении концентрации металла сохранялась практически неизменной. У *S. alba* активность фермента возрастала при использовании цинка в концентрациях 50 и 100 мг/кг субстрата в 6 и 9 раз соответственно, не изменяясь в дальнейшем (рис. 1в).

Важно также отметить, что в оптимальных условиях минерального питания (5 мг/кг субстрата) активность КАТ и ГвПО у растений *B. juncea* была гораздо выше, чем у *S. alba*.

Помимо антиоксидантных ферментов в защите клеток от избыточных количеств АФК большую роль играют неферментные компоненты АОС. Нами обнаружено, что у обоих изученных видов растений с увеличением концентрации цинка в субстрате возрастает содержание пролина в листьях, причем в большей степени у *S. alba* (табл. 4). Так, при наибольшей концентрации металла (150 мг/кг субстрата) у *B. juncea* оно повышалось в 2 раза по сравнению с контролем, а у *S. alba* — более, чем в 3 раза. Уве-

личения содержания каротиноидов у обоих видов в этих условиях не наблюдалось. Наоборот, оно снижалось у *B. juncea* на 28% по сравнению с контролем при использовании цинка в концентрации 150 мг/кг субстрата, а у *S. alba* — на 54%.

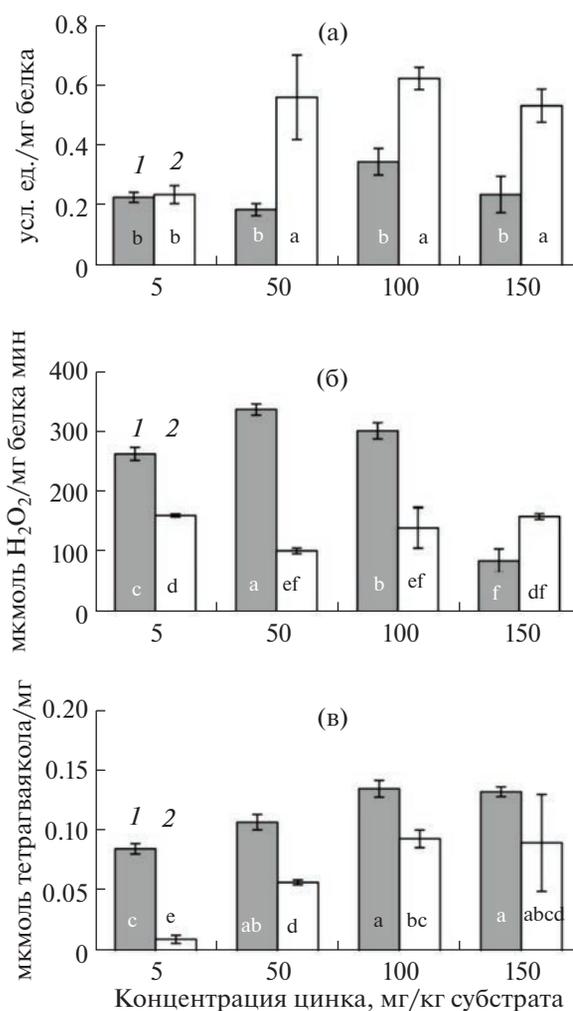


Рис. 1. Активность СОД (а), КАТ (б), ГвПО (в) в листьях 1 – *B. juncea* сорт Славянка и 2 – *S. alba* сорт Бельгия, при разных концентрациях цинка в субстрате. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними значениями при $P < 0.05$.

Таблица 4. Содержание пролина и каротиноидов в листьях растений *B. juncea* и *S. alba* при разных концентрациях цинка в субстрате

Вид	Концентрация цинка в субстрате, мг/кг	Содержание пролина, ммоль/г сырого веса	Содержание каротиноидов, мг/г сырого веса
<i>Brassica juncea</i>	5	5.29 ± 0.62c	0.25 ± 0.01a
	50	12.16 ± 0.66ab	0.18 ± 0.01b
	100	18.11 ± 0.36a	0.15 ± 0.01c
	150	10.63 ± 0.44b	0.18 ± 0.01b
<i>Sinapis alba</i>	5	6.11 ± 0.30c	0.28 ± 0.01a
	50	16.40 ± 1.97a	0.25 ± 0.01a
	100	22.95 ± 5.59a	0.18 ± 0.01b
	150	19.16 ± 4.05a	0.13 ± 0.01c

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

ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что цинк в высоких концентрациях негативно сказывается на физиологических процессах у растений и снижает их продуктивность [5, 31]. Однако некоторые виды из семейства *Brassicaceae*, в том числе *B. juncea* и *S. alba*, способны адаптироваться к высоким концентрациям этого металла в окружающей среде, что обеспечивается наличием у них механизмов, действующих на разных уровнях организации. Одним из важных механизмов металлоустойчивости растений является активизация в стрессовых условиях антиоксидантной системы, направленной на ликвидацию избыточных количеств активных форм кислорода в клетке [17, 31].

В целом ряде исследований показано, что при избытке цинка у растений семейства *Brassicaceae* заметно усиливается интенсивность ПОЛ, свидетельствуя о развитии окислительного стресса [10, 14, 31]. Однако в наших опытах у *B. juncea* повышения (по отношению к контролю) содержания МДА не было обнаружено ни при одной из изученных концентраций металла несмотря на высокую (150 мг/кг) концентрацию металла в побегах, что, очевидно, можно объяснить высокой устойчивостью растений этого вида к цинку (табл. 2, 3). В отличие от этого, в листьях *S. alba* наблюдалось усиление интенсивности ПОЛ при воздействии цинка в концентрациях 100 и 150 мг/кг субстрата. При этом содержание металла в надземной биомассе было выше, чем у *B. juncea* (табл. 2, 3). В ряде работ показаны сходные данные по изученным видам. Так, у растений *B. juncea* интенсивность ПОЛ практически не изменялась даже при концентрации цинка 500 мкМ [10, 32], тогда как у *S. alba* при концентрации металла 200 мкМ наблюдалось значительное повышение количества МДА [14].

Известно, что важную роль в защите клеток от избыточных количеств активных форм кислорода играют антиоксидантные ферменты, в том числе СОД, КАТ и ГвПО. Так, утилизация супероксид-радикала осуществляется в реакции дисмутации при участии ферментов СОД, которые в клетках представлены тремя изоформами: Cu/Zn-СОД, Mn-СОД и Fe-СОД [10]. При увеличении содержания анион-радикала в стрессовых условиях активность СОД, как правило, увеличивается. В наших опытах у *B. juncea* повышения активности СОД не было обнаружено даже при высоких концентрациях цинка в корнеобитаемой среде (рис. 1а). Аналогичные данные были получены и другими авторами при концентрации металла 50 и 300 мкМ [4, 10]. Подобный эффект может быть связан с отсутствием количества субстрата, необходимого для работы фермента, поскольку, судя по отсутствию изменений ПОЛ, значительного повышения содержания АФК (в том числе, супероксид радикала) в клетках не происходило. Кроме того, при сохранении неизменной общей активности СОД, могут изменяться активности разных ее изоформ. Например, у *B. juncea* при концентрации цинка в субстрате 300 мкМ активность Cu/Zn-СОД повышалась, тогда как активность Mn-СОД и Fe-СОД при этом снижалась [10], что, по мнению авторов, обусловлено дефицитом марганца и железа, наблюдаемого при избытке цинка. У *S. alba* общая активность СОД возрастала (рис. 1а). Поскольку, у растений этого вида в клетках листа развивался окислительный стресс, о чем можно судить по содержанию МДА (табл. 3), усиление активности фермента было направлено на ликвидацию избыточных количеств анион-радикала.

Функция КАТ как антиоксидантного фермента состоит в разложении перекиси водорода с выделением молекулярного кислорода. В ряде работ показано, что у *B. juncea* при избытке цинка актив-

ность КАТ повышается, например, при использовании металла в концентрации 1500 и 2000 мкМ [4, 10]. В наших опытах активность КАТ у растений этого вида также возрастала при концентрациях металла 50 и 100 мг/кг субстрата (рис. 16). Поскольку активность СОД в этом варианте опыта не изменялась, повышение количества H_2O_2 и, как следствие, увеличение активности КАТ, могло быть связано с усилением активности других ферментов, например, оксалатоксидазы, аминоксидаз и некоторых пероксидаз, проявляющих оксидазную активность [33].

Важно отметить, что у *S. alba*, несмотря на повышение активности СОД, увеличения активности КАТ не происходило (рис. 16). Наоборот, отмечалось некоторое ее снижение (по сравнению с контролем). Аналогичный эффект в листьях растений *S. alba* наблюдали также при концентрации цинка 500 и 1000 мг/кг субстрата, при которых двукратное повышение интенсивности ПОЛ сопровождалось снижением активности КАТ [14]. Возможно, это связано с тем, что определенный пул пероксида водорода должен поддерживается в клетке, поскольку H_2O_2 играет важную роль в сигналинге [17, 33], а также участвует в лигнификации клеточных стенок [34], что является одним из механизмов адаптации растений к избытку цинка.

В детоксикации избытка перекиси, образуемой у *S. alba* в ходе реакции дисмутации, вероятно, участие принимал другой фермент — ГвПО, увеличение активности которого было обнаружено уже при концентрации металла 50 мг/кг субстрата (рис. 1в). Однако активность этого фермента повышалась и у *B. juncea* (рис. 1в), что отмечалось и другими авторами, например, при концентрации цинка 5000 и 10000 мкМ [9] и у *B. rapa* при содержании цинка в почве 30 мг/кг [35]. Увеличение активности ПО при отсутствии изменений или даже снижении активности КАТ, возможно, является следствием более высокого сродства этого фермента к субстрату (H_2O_2), по сравнению с КАТ.

Важно также отметить, что у *B. juncea* в оптимальных условиях минерального питания активность КАТ и ПО была значительно выше, чем у *S. alba* (рис. 16, в). Аналогичные сведения указаны также в работах других авторов, которые показали, что растения с более высокой активностью антиоксидантных ферментов в отсутствии воздействия тяжелых металлов оказались более устойчивы к повышению их уровня в окружающей среде, что связано с лучшей защитой клеток от окислительного стресса [36, 37].

Известно, что при воздействии цинка в высоких концентрациях у растений усиливается активность неферментных компонентов АОС [30]. В частности, у *B. juncea* в условиях избытка металла (200 мг/кг субстрата) отмечено увеличение со-

держания пролина, что коррелировало с образованием в клетке свободных радикалов [8]. В ответ на обработку цинком в концентрации 2000 мкМ увеличивалось содержание пролина у *B. napus* [38]. В наших исследованиях цинк в концентрациях 50, 100 и 150 мг/кг субстрата также приводил к накоплению пролина в листьях *B. juncea* и *S. alba* (табл. 4). Поскольку известно, что пролин, среди прочего, обладает антиоксидантным эффектом и способен снижать содержание АФК [5], увеличение его содержания у обоих видов растений отчасти способствовало сохранению окислительно-восстановительного равновесия в клетках. Функцией нейтрализации АФК обладают также каротиноиды. Однако в большинстве случаев при воздействии цинка наблюдается снижение их содержания [5, 17, 30]. В наших опытах у *B. juncea* и *S. alba* содержание каротиноидов также уменьшалось в присутствии цинка в высоких концентрациях, причем в большей степени у *S. alba* (табл. 4). Ингибирующее действие избытка цинка на содержание пигментов, возможно, связано с некоторыми изменениями (нарушениями) в фотосинтетическом аппарате, например, с торможением их синтеза или нарушением работы фотосистемы II, что было обнаружено у *B. chinensis* и *B. alboglabra* [39]. Это могло быть также одной из причин торможения роста растений и уменьшения накопления ими биомассы в стрессовых условиях.

В целом, растения *B. juncea* и *S. alba* способны расти при избытке цинка в субстрате и при этом накапливать его в листьях в высоких концентрациях. Этому во многом способствует увеличение активности антиоксидантных ферментов и пролина, направленное на сохранение окислительно-восстановительного баланса клеток. При этом более высокая активность ферментов КАТ и ГвПО у растений *B. juncea* в отсутствие действия цинка и дальнейшее ее увеличение при возрастании концентрации металла в субстрате, а также увеличение содержания пролина способствовало сохранению интенсивности ПОЛ на уровне контроля. У растений *S. alba* повышение активности СОД и ПО, а также увеличение содержания МДА при воздействии цинка в концентрациях 100 и 150 мг/кг субстрата свидетельствует о развитии окислительного стресса в условиях избытка металла в субстрате. Меньшее снижение показателей роста побега у *B. juncea* по сравнению с *S. alba* позволяет сделать вывод о большей устойчивости растений этого вида к цинку в изученных концентрациях.

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

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22–24–00668). В работе использовано оборудование Центра кол-

лективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mourato P.M., Moreira I.N., Leitão I., Pinto F.R., Sales J.R., Martins L.L. Effect of heavy metals in plants of the genus *Brassica* // IJMS. 2015. V. 16. P. 17975. <https://doi.org/10.3390/ijms160817975>
2. Zeremski T., Randelović D., Jakovljević K., Jeromela A.M., Milić S. *Brassica* species in phytoextractions: real potentials and challenges // Plants. 2021. V. 10. P. 2340. <https://doi.org/10.1112340>
<https://doi.org/10.3390/plants>
3. Bortoloti G.A., Baron D. Phytoremediation of toxic heavy metals by *Brassica* plants: A biochemical and physiological approach // Environ. Adv. 2022. V. 8. P. 100204. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100204>
4. Małecka A., Konkolewska A., Hanć A., Barańkiewicz L.C., Ratajczak E., Staszak A.M., Kmity H., Jarmuszkiewicz W. Insight into the phytoremediation capability of *Brassica juncea* (v. Malopolska): metal accumulation and antioxidant enzyme activated // IJMS. 2019. V. 20. P. 4355. <https://doi.org/10.3390/ijms20184355>
5. Balafrej H., Bogusz D., Triqui Z.A., Guedira A., Bendaou N., Smouni A., Fahr M. Zinc hyperaccumulation in plants: a review // Plants. 2020. V. 9. P. 562. <https://doi.org/10.3390/plants9050562>
6. Xu J., Chai T., Zhang Y., Lang M., Han L. The cation-efflux transporter BjCET2 mediates zinc and cadmium accumulation in *Brassica juncea* L. leaves // Plant Cell Rep. 2009. V. 28. P. 1235. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0723-1>
7. Xu J., Zhang Y.X., Wei W., Han L., Guan Z.Q., Wang Z., Chai T.Y. BjDHNs confer heavy-metal tolerance in plants // Mol. Biotechnol. 2008. V. 38. P. 91. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-9005-8>
8. Khan M.I.R., Jahan B., Alajmi M.F., Rehman M.T., Khan N.A. Exogenously sourced ethylene modulates defense mechanisms and promotes tolerance to zinc stress in mustard (*Brassica juncea* L.) // Plants. 2019. V. 8. P. 540. <https://doi.org/10.3390/plants8120540>
9. Prasad K.V.S.K., Saradhi P.P., Sharmila P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea* // Environ. Exp. Bot. 1999. V. 42. P. 1.
10. Feigl G., Kolbert Z., Lehotai N., Molnár Á., Ördög A., Bordé Á., Laskay G., Erdei L. Different zinc sensitivity of *Brassica* organs is accompanied by distinct responses in protein nitration level and pattern // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2016. V. 125. P. 141. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.006>
11. Du X., Zeng T., Feng Q., Hu L., Luo X., Weng Q., He J., Zhu B. The complete chloroplast genome sequence of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) and its phylogenetic relationship to other *Brassicaceae* specie set // Gene. 2020. V. 731. P. 144340. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144340>
12. Stanisławska-Głubiak E., Karzeniowska J. Tolerance of white mustard (*Sinapis alba* L.) to soil pollution with several heavy metals // Ecol. Chem. Eng. A. 2001. V. 8. P. 445.
13. Zalewska M., Nogalska A. Phytoextraction potential of sunflower and white mustard plants in zinc-contaminated soil // Chil. J. Agric. Res. 2014. V. 74. P. 485. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000400016>
14. Soleimannejad Z., Sadeghipour H.R., Abdolzadeh A., Golalipour M. Physiological responses of white mustard grown in Zn-contaminated soilset // Acta Physiol. Plant. 2020. V. 42. P. 131. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03119-8>
15. Juskulak M., Grobelak A., Grosser A., Vandenbulcke F. Gene expression, DNA damage and other stress markers in *Sinapis alba* L. exposed to heavy metals with special reference to sewage sludge application on contaminated sites // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 181. P. 508. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.025>
16. Juskulak M., Grobelak A., Vandenbulcke F. Effects of sewage sludge supplementation on heavy metal accumulation and the expression of ABC transporters in *Sinapis alba* L. during assisted phytoremediation of contaminated sites // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2020. V. 197. P. 110606. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110606>
17. Sharama Sh.S., Dietz K.J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance // Trends Plant Sci. 2008. V. 14. P. 43. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.007>
18. Wang Ch., Zhang S.H., Wang P.F., Hou J., Zhang W.J., Li W., Lin Zh.P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings // Chemosphere. 2009. V. 75. P. 1468. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.033>
19. Yang H., Zhang J., Li J. Physiological response to zinc pollution of rape (*Brassica chinensis* L.) in paddy soil ecosystem // Adv. Mater. 2011. V. 356. P. 39. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.356-360.39>
20. Blasco B., Graham N.S., Broadley M.R. Antioxidant response and carboxylate metabolism in *Brassica rapa* exposed to different external Zn, Ca, and Mg supply // J. Plant Physiol. 2015. V. 176. P. 16. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.07.029>
21. Du J., Guo Zh., Li R., Ali A., Guo D., Lahori A.H., Wang P., Liu X., Wang X., Zhang Z. Screening of Chinese mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars for the phytoremediation of Cd and Zn based on the plant physiological mechanisms // Environ. Pollut. 2020. V. 216. P. 114213. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114213>
22. Stewart R.C., Bewley J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // Plant Physiol. 1980. V. 65. P. 245. <https://doi.org/10.1104/pp.65.2.245>
23. Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276.
24. Ershova M.A., Nikerova K.M., Galibina N.A., Sofronova I.N., Borodina M.N. Some minor characteristics of spectrophotometric determination of antioxidant system and

- phenolic metabolism enzyme activity in wood plant tissues of *Pinus sylvestris* L. // Protein Pept. Lett. 2022. V. 9. P. 711.
<https://doi.org/10.2174/0929866529666220414104747>
25. *Aebi H.* Catalase in vitro // Methods in Enzymol. 1984. V. 105. P. 121.
26. *Maehly A.C.* The assay of catalase and peroxidase // Meth. Biochem. Anal. 1954. V. 1. P. 357.
27. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.
28. *Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.* Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205.
29. *Wintermans J.E.G., De Mots A.* Spectrophotometric characteristics of chlorophyll *a* and *b* and their phaeophytins in ethanol // Biochim. Biophys. Acta. 1965. V. 109. P. 448.
[https://doi.org/10.1016/0926-6585\(65\)90170-6](https://doi.org/10.1016/0926-6585(65)90170-6)
30. НСАМ №499-АЭС/МС. Определение элементного состава горных пород, почв, грунтов и донных отложений атомно-эмиссионным с индуктивно связанной плазмой и массспектральным с индуктивно связанной плазмой методами (ред. 2015).
31. *Natasha N., Shanid M., Bibi I., Iqbal J., Khalid S., Murtaza B., Bakhat H.F., Farooq A.B.U., Amjad M., Hammad H.M., Niazi N.Kh., Arshad M.* Zinc in soil-plant-human system: A data-analysis review // Sci. Total Environ. 2022. V. 808. P. 152024.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152024>
32. *Alia Prasad K.V.S.K., Saradhi P.P.* Effect of zinc on free radicals and proline in *Brassica* and *Cajanus* // Phytochem. 1995. V. 39. P. 45.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00919-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00919-K)
33. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. 2002. V. 7. P. 405.
34. *Schutzendubel A., Polle A.* Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhizatin // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 1351.
35. *Dai H., Wei Sh., Skuza L., Jia G.* Selenium spiked in soil promoted zinc accumulation of Chinese cabbage and improved its antioxidant system and lipid peroxidation // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 180. P. 179.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.017>
36. *Srivastava M., Ma L.Q., Singh N., Singh Sh.* Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 1335.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri134>
37. *Mohmoud A., Elgawad H.A., Hamed B.A., Beemster G.T.S., El-Shafey N.M.* Differences in cadmium accumulation, detoxification and antioxidant defenses between contrasting maize cultivars implicate a role of superoxide dismutase in Cd tolerance // Antioxidants. 2021. V. 10. P. 1812.
<https://doi.org/10.3390/antiox10111812>
38. *Ghnaya A.B., Hourmant A., Cerantola S., Kervarec N., Cabon J.Y., Branchard M., Charles G.* Influence of zinc on soluble carbohydrate and free amino acid levels in rapeseed plants regenerated in vitro in the presence of zinc // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2010. V. 102. P. 191.
<https://doi.org/10.1007/s11240-010-9721-9>
39. *Lin M.Z., Jin M.F.* Soil Cu contamination destroys the photosynthetic systems and hampers the growth of green vegetables // Photosynthetica. 2018. V. 56. P. 1336.
<https://doi.org/10.1007/s11099-018-0831-7>

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1:57.02

**ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* НА РОСТ
ПРОРОСТКОВ И ЛИГНИФИКАЦИЮ КОРНЕЙ *Pisum sativum* L.
В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ НАТРИЙ-ХЛОРИДНОГО ЗАСОЛЕНИЯ**

© 2023 г. О. В. Ласточкина^{а, *}, С. Р. Гарипова^{б, с}, Л. И. Пусенкова^б, Д. Ю. Гаршина^б,
Ан. Х. Баймиев^{а, с}, И. С. Коряков^а

^а Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

^б Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

^с Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

*e-mail: oksana.lastochkina@ufaras.ru

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 06.03.2023 г.

Исследовано влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* (штамм 10-4) на параметры роста и устойчивости, а также интенсивность отложения лигнина в корнях проростков *Pisum sativum* L. в условиях натрий-хлоридного засоления (1% NaCl). Установлено, что воздействие засоления снижало энергию прорастания, всхожесть, длину корней и побегов проростков, их сырую и сухую массу, а также увеличивало содержание пролина и уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ). Предобработка штаммом 10-4 оказывала стимулирующий в норме и защитный при засолении эффекты на проростки, что отразилось в улучшении энергии прорастания и всхожести семян, длины корней и накоплении их сухой массы в условиях засоления; однако по показателям роста побегов при стрессе существенной разницы от контрольных (небактеризованных) вариантов не наблюдалось. В то же время, штамм 10-4 способствовал более раннему формированию боковых корней, а также снижению стресс-индуцированного ПОЛ и содержания пролина в проростках, что свидетельствует о защищенности клеток от окислительных и осмотических повреждений в условиях засоления. Получены приоритетные данные о важной роли эндофитного штамма *B. subtilis* 10-4 в процессе лигнификации и укреплении барьерных свойств клеточных стенок корней, что вносит вклад в снижение токсического действия натрий-хлоридного засоления и реализацию протекторного действия этих бактерий на растения гороха.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, *Pisum sativum*, засоление, лигнин, рост, устойчивость

DOI: 10.31857/S0015330322600838, **EDN:** PBOYSX

ВВЕДЕНИЕ

Засоление почв относится к числу наиболее распространенных абиотических стресс-факторов окружающей среды, приводящих к ингибированию роста и снижению урожайности культурных растений, что несет угрозу сельскохозяйственному производству и продовольственной безопасности в мире [1]. В связи с климатическими изменениями негативное воздействие засоления на пахотные земли усиливается. В растениях засоление вызывает окислительные и осмотические повреждения, дефицит воды, закрытие устьиц, снижение фотосинтетической активности и потерю урожайности [2].

Для преодоления стрессовых воздействий, включая засоление, интерес вызывает применение экологически ориентированных технологий при

выращивании растений [3]. Применение полезных рост-стимулирующих бактерий (PGPB, Plant Growth-Promoting Bacteria) может снизить вредное воздействие засоления на растения и улучшить их рост без побочных эффектов, как для самого растения, так и окружающей среды [3, 4]. К настоящему времени накоплен большой массив данных о способности PGPB прямо или опосредованно улучшать рост и развитие разных видов растений в норме и при воздействии различных стресс-факторов биотической и абиотической природы, тем самым повышая урожайность и качество продукции [3–5]. Физиологическое и антистрессовое действия PGPB на растения связывают с улучшением минерального питания [6], водного обмена, фотосинтеза [7], продукцией множества биологически активных соединений с

антибиотической [8, 9], фитогормоноподобной [10, 11], осморегуляторной и антиоксидантной [4, 5, 12] активностями, модуляцией эндогенных фитогормонов [13, 14] и запуском системной устойчивости растений [5, 7, 8]. Все вышеупомянутые эффекты регулируются сложным набором специфических, множественных и взаимосвязанных механизмов, которые еще нуждаются в раскрытии. Кроме того, эффективность конкретного штамма RGPB зависит от различных его характеристик, включая синтез соединений, ответственных за стимуляцию роста и индукцию устойчивости растений [8], а также способности колонизировать поверхность (эпифиты) или внутренние ткани (эндифиты) растений [4, 15, 16].

Эндофитные RGPB являются наиболее привлекательными для практического применения с целью улучшения роста и развития растений в условиях длительных стрессов, так как благодаря стабильному рН, влажности, потоку питательных веществ, отсутствию конкуренции со стороны большого количества микроорганизмов они способны воздействовать на метаболизм растения изнутри вне зависимости от факторов окружающей среды [15, 16]. Экологическая роль эндофитного сообщества, тесно связанного с растением-хозяином, в настоящее время недостаточно изучена. Однако находится все больше подтверждений тому, что “спрятанный внутри растений мир” имеет непосредственное отношение к таким процессам в жизни растений, как регуляция роста и развития, фитоиммунитет и приспособление к меняющимся условиям существования [17]. Ассоциированные с растениями микроорганизмы представляют собой совокупный генетический ресурс, с которым они образуют единую информационную и функциональную сеть, особенно востребованную при воздействии неблагоприятных биотических и абиотических факторов [16]. Этот подход был сформулирован как “принцип дополнительности геномов” [18], позволяющий существенно расширить адаптивные возможности растений в преодолении стрессов.

Бобовые растения интересны тем, что в их физиологическое состояние вносят вклад как ризобийные, так и эндофитные неризобийные микроорганизмы [19]. В связи с этим представляет интерес изучение роли эндофитных бактерий в поддержании адаптивных возможностей бобовых растений [19, 20]. *Pisum sativum* L. – важная бобовая культура, чувствительная к солевому стрессу, четко определяемому как наличие избыточного количества солей (растворимых) в почве, препятствующих росту и функционированию растений [1]. Засоление вызывает у растений окислительный и осмотический стрессы, снижает способность корневой системы поглощать воду и, следовательно, увеличивается потеря воды листьями. Накопление большого количества солей растени-

ями влечет за собой различные физиологические изменения, в том числе дисбаланс питательных веществ, разрыв мембран, нарушение способности к детоксикации активных форм кислорода (АФК), колебания синтеза и активности антиоксидантных ферментов, уменьшение устьичного отверстия и минимизацию фотосинтетической активности [20]. В результате вызванных засолением окислительных повреждений в клетках накапливаются в большом количестве денатурированные белки, продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые могут быть не только первичными медиаторами стрессового воздействия, но и индукторами соответствующих защитных механизмов в растительных клетках, о развитии которых можно судить по степени накопления в них малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта ПОЛ [21, 22]. Для предотвращения повреждающего действия стресс-факторов и поддержания оптимального водного режима в растениях активно экспрессируются гены, кодирующие белки с функциями молекулярных шаперонов, протеаз и ингибиторов протеаз. При этом индуцируется образование ранее отсутствующих низкомолекулярных органических соединений (аминокислот, сахаров, бетаинов) с осмопротекторными свойствами [21, 22], к каковым относится пролин [23, 24], часто используемый в качестве биомаркера уровня осмотического стресса растений. Важную роль в защите растений от токсического действия засоления играет укрепление их барьерных свойств через усиление лигнификации [25], однако сведения о влиянии эндофитов на этот процесс практически отсутствуют. Понимание основных механизмов, лежащих в основе взаимодействия между эндофитными бактериями и растениями гороха в условиях стрессовых воздействий, включая засоление, имеет большое значение для раскрытия потенциала их применения.

Цель настоящей работы состояла в оценке влияния предпосевной обработки семян эндофитными бактериями *B. subtilis* (штамм 10-4) на параметры роста, уровень ПОЛ, пролина и лигнификацию клеточных стенок корней проростков гороха в норме и при натрий-хлоридном засолении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и бактериальный штамм. Объектом исследования служили проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Памяти Хангильдина) [26]. Семена предоставлены Чишминским селекционным центром Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (г. Уфа). Штамм *Bacillus subtilis* 10-4 был ранее выделен из пахотных почв Республики Башкортостан (г. Уфа), идентифицирован с помощью анализа 16S РНК, детально охарактеризован [4, 14] и депонирован в Национальном биоресурс-

ном центре — Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (№ В-12988 от 23.06.2019 г.).

Приготовление бактериальной суспензии (инокулюма). Для получения инокулюма штамм 10-4 культивировали на среде Luria-Bertani (LB) при 37°C (180 об/мин, 24 ч) до достижения концентрации 10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл и разбавляли стерильной водой до концентрации 10^5 КОЕ/мл, отобранной ранее в качестве оптимальной в стимуляции роста и защите растений от стрессов [4, 14]. Концентрацию клеток определяли при 600 нм (Spectrophotometer SmartSpecTM Plus, “Bio-Rad”, США).

Обработка семян, схема экспериментов и условия выращивания. Семена стерилизовали в 96% этаноле (1 мин), промывали 3 раза стерильной водой и погружали в суспензию *B. subtilis* 10-4 (10^5 КОЕ/мл) (опыт) или воду (контроль) на 1 ч. Далее семена выращивали: 1) на чашках Петри с фильтровальной бумагой с 10 мл дистиллированной воды (норма) или 1% NaCl (стресс) при 21–24°C в темноте в течение 8 сут (25 семян в каждой чашке Петри в 6-ти повторностях) и на 4 и 8 сут оценивали энергию прорастания (%) и всхожесть (%) соответственно; 2) на чашках Петри с фильтровальной бумагой с 10 мл дистиллированной воды при 21–24°C в темноте в течение 3 сут, после чего проростки переносили в стаканы с водой (норма) или 1% NaCl (стресс), и продолжали выращивать на светоплощадке при 21–24°C (16 ч день/8 ч ночь, 200 мкмоль / (м² с) ФАР). Далее через разные промежутки времени оценивали ростовые параметры (4, 5 и 8-суточные проростки); содержание пролина, ПОЛ определяли через 24 ч воздействия стресса (4-суточные проростки), лигнификацию корней — через 96 ч воздействия стресса (8-суточные проростки).

Оценка уровня ПОЛ. Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию в проростках конечного продукта ПОЛ, МДА, с помощью цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [27]. Проростки (0.5 г) растирали с 3 мл дистиллированной воды, добавляли 3 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и центрифугировали (10000 g, 10 мин). К 2 мл надосадочной жидкости добавляли 2 мл 0.5% ТБК в 20% ТХУ, инкубировали при 100°C (30 мин), далее раствор охлаждали и измеряли оптическую плотность при 532 нм и 590 нм (Spectrophotometer SmartSpecTM Plus, “Bio-Rad”, США). Концентрацию МДА вычисляли с использованием коэффициента молярной экстинкции 155000 л/(см моль).

Определение содержания пролина. Содержание пролина оценивали с помощью нингидринового реактива [28]. Проростки (0.5 г) заливали 5 мл кипящей дистиллированной воды, инкубировали при 100°C (30 мин) и охлаждали. Далее 1 мл экстракта смешивали с 1 мл нингидринового реакти-

ва и 1 мл ледяной уксусной кислоты, инкубировали при 100°C (1 ч) и охлаждали. Оптическую плотность растворов измеряли при 522 нм (Spectrophotometer SmartSpecTM Plus, “Bio-Rad”, США).

Оценка отложения лигнина. Интенсивность отложения лигнина в корнях определяли по способности флороглюцина избирательно окрашивать лигнин в красно-фиолетовый цвет согласно [29] с модификациями. Брали живые проростки, делали продольные и поперечные срезы в базальной зоне корней с использованием криостата Leica CM1520 (“Leica Biosystems”, Германия) при –30°C. Для заливки использовали жидкость для заморозки образцов Tissue Freezing Medium (“Leica Biosystems”, Германия). Толщина среза составляла 60 мкм. Свежие срезы сразу помещали на предметное стекло с 5% флороглюцином (“ЗАО Вектон”, Россия) на 3 мин. Предметные стекла со срезами обрабатывали 3–4 каплями 10% HCl и проводили визуализацию с помощью флуоресцентного сканирующего микроскопа Biozero BZ-8100E (“Keyence Co.”, Япония). Количественное определение содержания лигнина по степени окраски проводили с помощью программного обеспечения для обработки изображений ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>). В каждом варианте опыта оценивалось по четыре среза в трехкратной повторности.

Оценка способности тестируемого штамма *B. subtilis* 10-4 колонизировать внутренние ткани растений (эндофитность). Для определения эндофитности *B. subtilis* 10-4 семена гороха (выборка 10 семян) погружали на 15 мин в 0.2% диацид, затем пятикратно промывали стерильной водой. Для контроля поверхностной стерилизации последний смыв высевали на картофельно-декстрозный агар (PDA, Potato Dextrose Agar, “HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.”, Индия) и убеждались в отсутствии роста бактерий в течение 7 сут при 28°C. Простерилизованные семена инокулировали *B. subtilis* 10-4 (10^5 КОЕ/мл) путем погружения на 30 мин, проращивали на влажных стерильных бумажных фильтрах в течение 5 сут при 28°C. Затем поверхность проростков стерилизовали путем погружения в 70% этанол на 5 мин, после чего этанол сливали и промывали стерильной водой. Асептически срезанные сегменты проростков обжигали в течение 2 с над пламенем, раскладывали в чашки Петри с питательной PDA средой и инкубировали в течение 76 ч при 28°C. Чистые культуры изолятов, выросших вокруг поверхностно стерилизованных сегментов проростков, анализировали на идентичность исходному, использованному для инокуляции семян штамму *B. subtilis* 10-4, с помощью случайной амплификации полиморфной ДНК (Random amplification of polymorphic DNA, RAPD-ПЦР) (выборка 8 культур с 4-ех проростков).

Выделение ДНК из бактерий. Бактериальную ДНК выделяли с использованием буфера для лизиса (1% триптон × 100, 1% твин-20, 1% хелекс 100, 0.005% крезол красный, вода). Генетический полиморфизм штаммов оценивали по результатам RAPD-ПЦР тотальной ДНК с использованием праймеров AFK (50-GCGTCCATTC-30). Амплификацию проводили на оборудовании Терцик (“ДНК-Технологии”, Россия). Анализ и визуализацию продуктов RAPD-анализа проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1.5% ПААГ в камере SE-2 (“Хеликон”, Россия) при 25 кВ (1 ч). Гель окрашивали бромистым этидием, результаты регистрировали с помощью Gel Doc XR (“Bio-Rad”, США).

Оценка рост-стимулирующих (PGP) характеристик и физико-химических свойств тестируемого штамма *B. subtilis* 10-4. Оценка способности штамма продуцировать ИУК, сидерофоры, солибилизовать фосфаты, фиксировать атмосферный азот проводили общепринятыми методами [14]. Основные физико-химические свойства (оксидазная, каталазная, β-галактозидазная, уреазная, фенилаланин-дезаминазная активности, реакция Фогеса-Проскауэра) определяли с помощью тест-систем (системы индикаторные бумажные (СИБ) для идентификации микроорганизмов, набор №2) (“МикроГен”, Россия). СИБ представляют собой диски или полоски хроматографической бумаги, содержащие определенные количества субстрата в сочетании с индикатором, стабилизированные пленкообразующим покрытием – поливиниловым спиртом. При положительной (“+”) реакции штамм изменял цвет субстрата в растворенном виде или цвет полоски в соответствии с таблицей учета результатов исследования, что свидетельствовало об активности фермента или метаболическом преобразовании/накоплении тестируемого субстрата; в противном случае констатировали отрицательную реакцию (“-”) (https://rbpharm.ru/wp-content/uploads/2020/02/Instr_SIB-NAFOR-2-463-598836.pdf).

Статистический анализ. Все опыты проводили в трех биологических и трех-четырёх аналитических повторах. Статистическую обработку выполняли с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0 (“StatSoft, Inc.”, США). Статистические сравнения выборочных средних проводили с использованием критерия Стьюдента. На рисунках и в таблицах представлены средние значения (M) и их стандартные отклонения ($\pm SD$) при $P = 0.95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В нормальных условиях произрастания была выявлена четкая тенденция к увеличению под влиянием предобработки *B. subtilis* 10-4 длины корней, побегов, а также сырой и сухой массы

проростков гороха (рис. 1). Интересно, что в норме при инокуляции *B. subtilis* 10-4 у проростков гороха на 3-и сутки длина корня превышала на 60% длину корней контрольных небактеризованных проростков. Но затем, к 4-ым суткам, темп роста корня бактеризованных проростков замедлился по сравнению с ростом корня контрольных проростков (рис. 1в). Однако, начиная с 5-ых суток и далее, вновь наблюдалось увеличение длины корней и побегов по сравнению с контролем. Причем, на 5-е сутки у бактеризованных вариантов отмечено появление боковых корней (тогда как в контроле их еще не наблюдалось) и возобновлялся рост в длину (рис. 1в).

Обнаружено, что присутствие в среде выращивания гороха 1% хлорида натрия (засоление) приводило к снижению энергии прорастания (на 50%) (рис. 1а), всхожести (на 40%) (рис. 1б), линейных размеров корней (на 68%) и побегов (на 72%), а также снижению накопления их сырой и сухой массы (рис. 1в–д) в сравнении с контрольными вариантами. В то же время предобработка *B. subtilis* 10-4 способствовала снижению повреждающего действия засоления на энергию прорастания (рис. 1а), всхожесть (рис. 1б) и рост корней проростков гороха (рис. 1в). В частности, по сравнению с контрольными (небактеризованными) проростками в условиях засоления в предобработанных *B. subtilis* 10-4 вариантах энергия прорастания и всхожесть семян при стрессе увеличивались до 59–63% (при контроле 48%) (рис. 1а) и до 94% (при контроле 66%) (рис. 1б), длина корней бактеризованных проростков к 8-ым суткам составляла 2.8 см (на 40% больше, чем в контроле) (рис. 1в, г). Кроме того, было выявлено увеличение (на 14%) сухой массы корней у предобработанных *B. subtilis* 10-4 и выращенных в присутствии засоления проростков гороха (рис. 1д). Вместе с тем несмотря на то, что в условиях засоления бактеризованные проростки гороха характеризовались более длинными корнями и сухой массой по сравнению с небактеризованными, в длине побегов существенной разницы от контроля не было выявлено (рис. 1д). На протяжении всего эксперимента также не наблюдалось и существенного влияния бактерий *B. subtilis* 10-4 на сырую массу корней, побегов и сухую массу побегов при засолении.

Далее была проведена работа по подтверждению эндофитности бактерий *B. subtilis* 10-4, то есть их способности населять внутренние ткани проростков гороха. Так, из поверхностно стерилизованных корней проростков гороха, предобработанных штаммом *B. subtilis* 10-4, были получены чистые культуры бактерий, которые идентифицировали с помощью RAPD-ПЦР анализа. На основе сравнения полученных электрофореграмм с RAPD-профилем исходного штамма *B. subtilis* 10-4 была установлена идентичность выделенных из

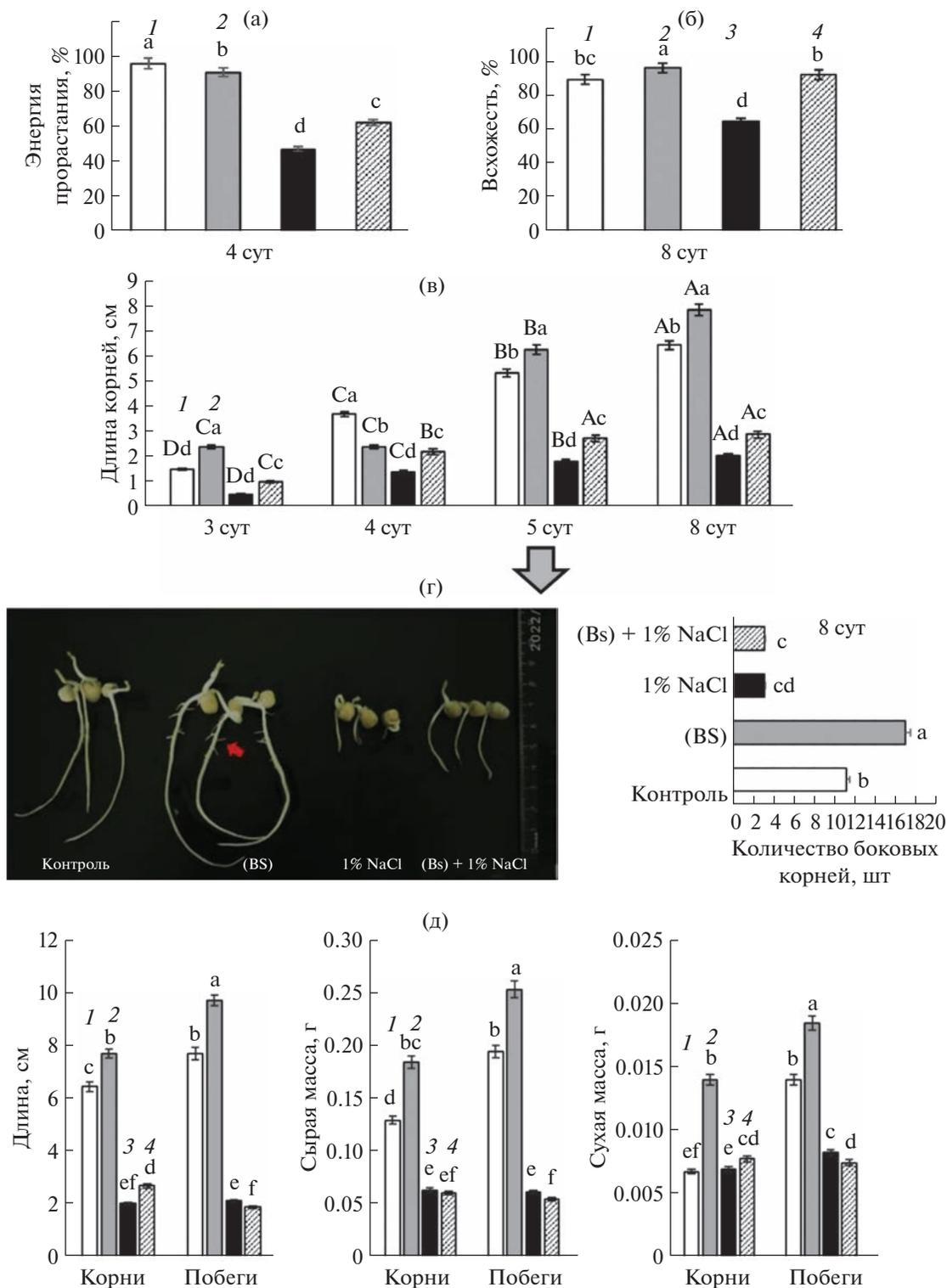


Рис. 1. Влияние *B. subtilis* 10-4 (BS) на энергию прорастания (а), всхожесть (б), длину корней (в), количество боковых корней (г), а также длину побегов и накопление сырой и сухой массы корней и побегов (д) проростков гороха, произраставших в норме и при натрий-хлоридном засолении (1% NaCl). 1 – контроль, 2 – (BS), 3 – 1% NaCl, 4 – (BS) + 1% NaCl. Красной стрелкой указано начало формирования боковых корней у проростков гороха на 5-е сутки выращивания. Различные строчные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для различных вариантов в один и тот же момент времени различаются при $P < 0.05$. Различные заглавные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для каждого варианта обработки в разные моменты времени различаются при $P < 0.05$.

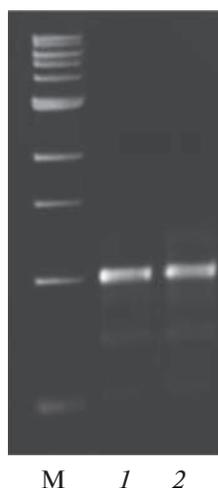


Рис. 2. Сравнительный анализ ДНК чистых культур бактерий, полученных из внутренних тканей корня проростков гороха, семена которых были обработаны штаммом *B. subtilis* 10-4, и исходного штамма. Электрофореграмма ПААГ после RAPD-ПЦР анализа: М – ДНК маркер; 1 – ДНК исходного штамма *B. subtilis* 10-4; 2 – ДНК бактерии, выросшей вокруг поверхностно стерилизованных инокулированных *B. subtilis* 10-4 сегментов гороха.

внутренних тканей предобработанных проростков бактерий с исходным штаммом *B. subtilis* 10-4 (рис. 2). Кроме того, получены данные о способности штамма 10-4 продуцировать ИУК, сидерофоры, фиксировать атмосферный азот (табл. 1), вносящих важный вклад в стимуляцию ростовых процессов растений этими бактериями (рис. 1).

Обнаружено почти двукратное повышение уровня ПОЛ (о чем судили по содержанию МДА) в 4-суточных проростках гороха в условиях засоления (рис. 3). Предобработка *B. subtilis* 10-4 существенно снижала уровень стресс-индуциро-

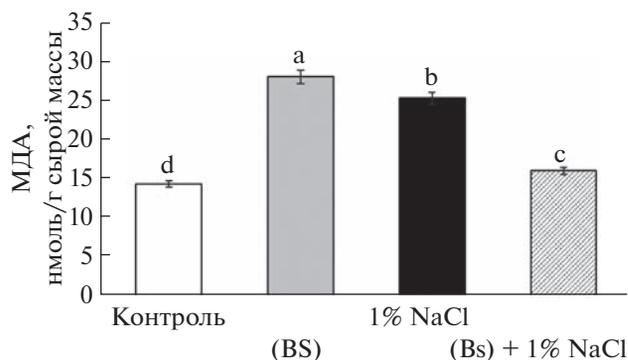


Рис. 3. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 (BS) на содержание МДА в 4-суточных проростках гороха в норме и при засолении. Время воздействия стресса (1% NaCl – 24 ч). Различные строчные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для различных вариантов различаются при $P < 0.05$.

ванного накопления МДА, что свидетельствует об ослаблении окислительных повреждений клеток у этих проростков. Однако интересно, что в нормальных условиях произрастания повышенный уровень МДА наблюдался в предобработанных штаммом 10-4 проростках по сравнению с контролем (рис. 3), но при этом сопровождался усиленным ростом корней в длину (рис. 1в–д), увеличением как сырой, так и сухой массы корней, и что важно – усилением развития боковых корней (рис. 1г, д).

Установлено, что в корнях стрессированных проростков гороха без бактериальной обработки содержание осмопротектанта пролина было почти в 3 раза выше, чем в контроле без стресса (рис. 4). В то же время, как в нормальных условиях произрастания, так и в условиях засоления предобра-

Таблица 1. Некоторые рост-стимулирующие (PGP) характеристики и физико-химические свойства штамма *Bacillus subtilis* 10-4

Параметры	штамм <i>Bacillus subtilis</i> 10-4
ИУК, мг/л	5.80 ± 0.2
Продукция сидерофоров, см	1.20 ± 0.1
Солюбилизация фосфатов, мг/л	–
Фиксация атмосферного азота, мкг N_2 /(мл ч)	0.08 ± 0.02
Оксидазная активность	–
Каталазная активность	+
β -галактозидазная активность	–
Уреазная активность	+
Фенилаланин-дезаминазная активность	–
Реакция Фогеса-Проскауэра	+

Примечание: “+” положительная реакция (активность детектируется тестом); “–” отрицательная реакция (активность отсутствует).

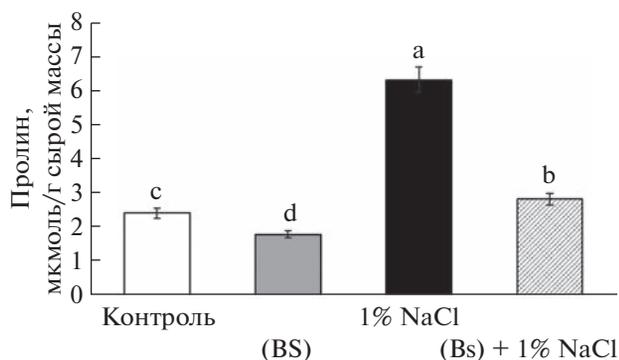


Рис. 4. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 на содержание пролина в 4-суточных растениях гороха в норме и при засолении. Время воздействия стресса (1% NaCl – 24 ч). Различные строчные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для различных вариантов различаются при $P < 0.05$.

ботка *B. subtilis* 10-4 способствовала снижению содержания пролина на 26% и 47% соответственно, в сравнении с небактеризованными вариантами (рис. 4).

Помимо осмотических и окислительных повреждений клеток растений, засоление также оказывает существенное влияние на клеточную стенку, укреплению которой способствует процесс лигнификации. В связи с этим нами был проведен сравнительный анализ отложения лигнина на продольных и поперечных срезах базальной части корней проростков гороха, предобработанных *B. subtilis* 10-4 и подвергнутых натрий-хлоридному засолению. Выявлено, что воздействие засоления усилило лигнификацию в корнях растений гороха по сравнению с контрольными вариантами, растущими в норме. При этом, накопление лигнина происходило как во внутренних центральных цилиндрах, так и по всей периферии внешней оболочки корня (рис. 5), что может указывать на повышение защитных реакций растений в ответ на воздействие стрессового фактора (1% NaCl). Предобработка *B. subtilis* 10-4 способствовала дополнительному усилению отложения лигнина в корнях по сравнению с небактеризованными вариантами. Следует отметить, что в норме штамм 10-4 также способствовал интенсификации отложения лигнина в корнях в сравнении с небактеризованным контролем. Таким образом, важный вклад в индуцированное штаммом 10-4 повышение устойчивости проростков к засолению вносит их способность еще до воздействия стрессора ускорять отложение лигнина в клеточных стенках корней, что, однако, не препятствует проявлению рост-стимулирующего действия штамма в ходе предобработки, вероятно, благодаря способности продуцировать ауксины и другие метаболиты с рост-регулирующими свойствами (табл. 1).

Совокупность полученных результатов демонстрирует способность *B. subtilis* 10-4 при предпо-

севном способе обработки стимулировать ростовые процессы растений гороха в нормальных условиях и оказывать защитный эффект на прорастание и всхожесть семян, на рост корней и целое растение в условиях засоления. Получены приоритетные данные о важной роли эндофитных бактерий *B. subtilis* 10-4 в процессе лигнификации клеток корней гороха, что вносит важный вклад в снижение токсического действия соли на растения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Применение полезных эндофитных PGPB *B. subtilis* может являться важным подходом для повышения выживаемости растений в стрессовых условиях, включая засоление. В настоящее время приходится констатировать, что положительный эффект от применения микробных биопрепаратов в растениеводстве проявляется далеко не всегда, и в большой степени результат определяется особенностями генотипов симбиотических партнеров. Выявленное в условиях засоления торможение роста проростков гороха было ожидаемым и согласуется с имеющимися в литературе данными [2, 10, 30, 31]. Снижение стресса под влиянием инокуляции гороха эндофитными бактериями также совпадает с имеющимися данными о благотворном влиянии PGPB на рост и развитие различных видов растений в условиях абиотических стрессов [3–5, 12, 30], включая засоление [10, 31, 32]. Однако результаты взаимодействия штамма 10-4 с растениями гороха, и, в частности, с районированным сортом гороха Памяти Хангильдина, а также их влияние на лигнификацию корней растений представлены впервые. Выявленная способность штамма 10-4 стимулировать рост главного и боковых корней в условиях засоления (рис. 1в, г) свидетельствует о том, что бактериализованные растения гороха были защищены от стресса (в сравнении с небактеризованными) и продолжали получать питание и воду. Недолговременное торможение роста корня в длину относительно контроля на 4-е сутки у бактериализованных проростков в норме могло быть связано с модуляцией штаммом 10-4 фитогормонального баланса в корнях [11, 13], перераспределением ресурсов в сторону побега и/или переходу к закладке боковых корней. Действительно, на 5-е сутки бактериализованные проростки имели сформировавшиеся боковые корни, тогда как в контроле их не было (рис. 1г). Разные генотипы растений могут по-разному отзываться на инокуляцию разными штаммами бактерий, в частности, это может быть связано с особенностями бактериальных штаммов [5]. Обнаруженные эффекты влияния штамма 10-4 на рост растений гороха (рис. 1) могут быть связаны с такими его характеристиками как продукция ИУК, сидерофоров, а также фиксацией

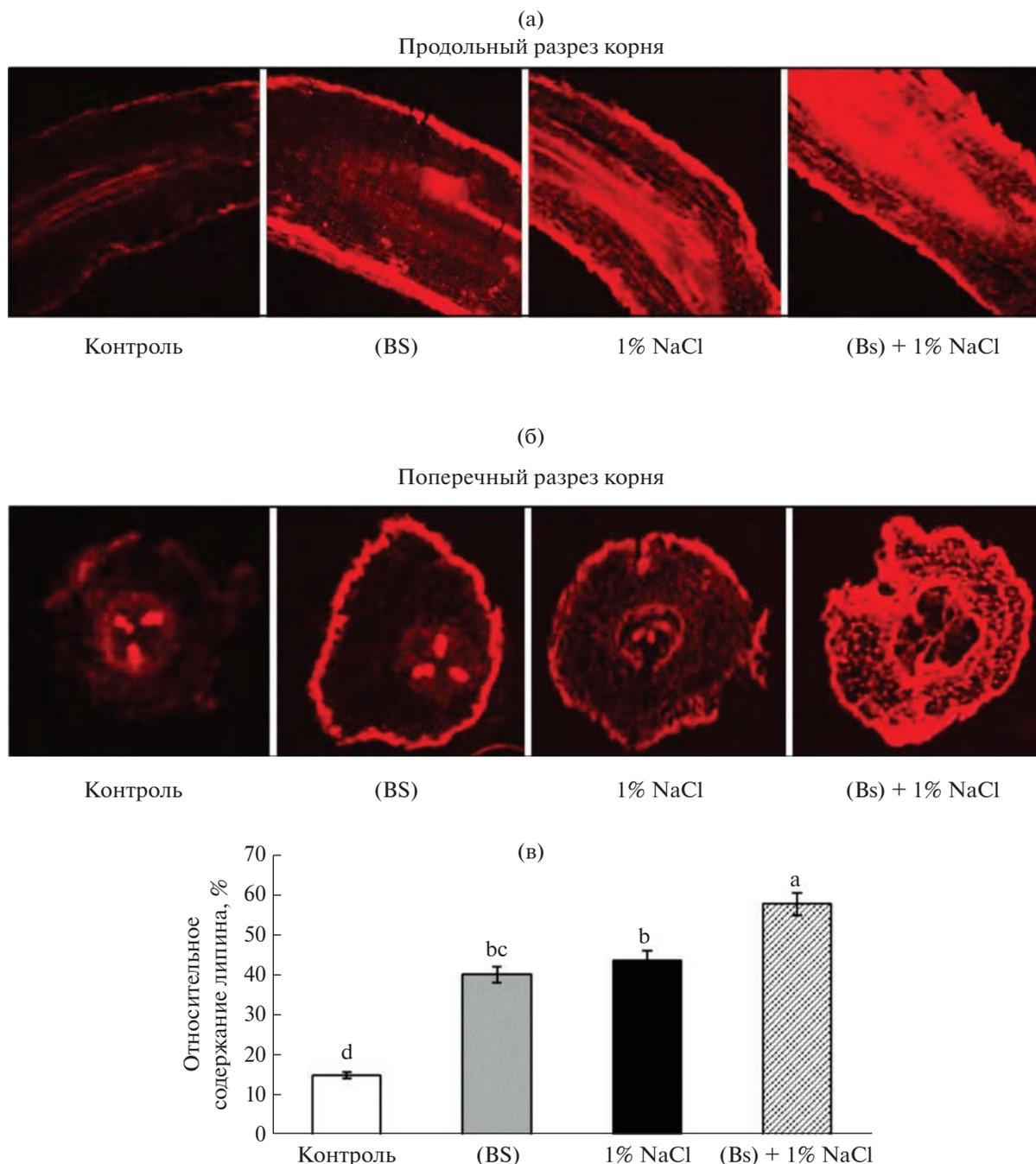


Рис. 5. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 на отложение лигнина в корнях 8-суточных растений гороха сорта Памяти Хангильдина в нормальных условиях произрастания и при засолении. Время воздействия стресса (1% NaCl – 96 ч). На снимках представлены продольные (а) и поперечные (б) срезы корней, визуализированные с помощью флуоресцентного сканирующего микроскопа Biozero BZ-8100E (Keyence Co., Осака, Япония). Количественное определение содержания лигнина по степени окраски (в) проводили с использованием программного обеспечения для обработки изображений ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>). В каждом варианте опыта оценивалось по четыре среза в трехкратной повторности. Различные строчные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для различных вариантов различаются при $P < 0.05$.

атмосферного N (табл. 1), модулирующих реакцию растений и ответственных за установление взаимодействия между растениями и микробами [5]. В частности, способность *B. subtilis* 10-4 улучшать всхожесть, прорастание семян и рост расте-

ний гороха в норме и при засолении (рис. 1), вероятно, связана с продукцией ауксинов, играющих важную роль в регуляции деления клеток, пролиферации и дифференцировке клеток и тканей, развитии сосудистых тканей, удлинении кле-

ток и апикальном доминировании в растениях. В целом, увеличение длины корней позволяет растениям улучшить поглощение микро-/макроэлементов, ускорять рост и формировать стрессоустойчивость. Сообщалось, что *Bacillus* sp. используют продуцируемые ауксины для взаимодействия с растениями в рамках их стратегии колонизации, включая фитостимуляцию и обход основных защитных механизмов растений [5]. Очевидно, влияние эндофитных *B. subtilis* 10-4, обусловившее выживание растений гороха при засолении, также могло быть связано с изменением гормонального статуса и архитектуры корней с более глубокой и разветвленной корневой системой, обеспечивающей растения водой для лучшего роста и развития.

Колонизация бактериями эндоризосферы является одним из важнейших доказательств их эндофитных свойств и фактором, влияющим на биологическую активность в растительно-микробных отношениях [16, 17]. Идентичность RAPD-профилей бактерий, выделенных из поверхностно стерилизованных растений, семена которых были предобработаны штаммом 10-4, и RAPD-профиля исходного штамма (рис. 2) являлась доказательством их эндофитности. Ранее эндофитность данного штамма была подтверждена при взаимодействии с растениями фасоли [4] и пшеницы [14]. Колонизация эндофитами на начальном этапе взаимодействия обычно вызывает у растений иммунный ответ, сходный с таковым против патогенов, но позже мутуалисты избегают защитных реакций хозяина и способны успешно колонизировать растения [17]. Была высказана гипотеза, что одним из критериев для определения чувствительности хозяина к присутствию эндофитов может служить содержание в растительных тканях МДА [24]. Приводятся доказательства того, что увеличение количества МДА может свидетельствовать о процессах акклиматизации, а не только о повреждении мембран, поскольку МДА может активировать регуляторные гены, участвующие в защите и развитии растений в условиях окислительного стресса [22]. В литературе можно найти противоречивые сведения о содержании МДА в предобработанных эндофитами растениях в нормальных условиях. Так, в экспериментах с саженцами яблони было отмечено варьирование концентрации МДА в зависимости от инокуляции разными штаммами, при этом более высокий уровень симптомов окислительного стресса в одних случаях согласовывался с негативным влиянием штамма на рост побегов, в других – уровни МДА были сопоставимы с таковыми у штаммов, стимулирующих рост и пролиферацию побегов [33]. При инокуляции риса эндофитные бактерии вызывали контрастные реакции растений по уровню МДА, сохраняя при этом растения метаболически сбалансированными без признаков

угнетения роста [34]. Высокие уровни МДА были обнаружены в делящихся клетках в зоне пролиферации клеток кончика корня *Arabidopsis* [35]. Выявленное нами увеличение МДА в предобработанных штаммом 10-4 проростках гороха, вероятно, связано с системными перестройками под влиянием сигнальных факторов бактерий, запустивших адаптационные процессы растения, включая клеточное деление (появление боковых корней), благодаря продукции бактериями стимулирующих рост соединений (табл. 1). Для понимания сложных процессов окислительно-восстановительной биологии имеет значение баланс между продукцией, элиминацией и передачей сигналов МДА, обуславливающий выживаемость растений в условиях стресса [22]. Что касается снижения уровня стресс-индуцированного накопления МДА у бактериализованных растений, то подобные эффекты описаны в литературе и связываются со способностью PGPB к контролю уровня АФК за счет модуляции активности антиоксидантных ферментов и снижения окислительных повреждений, вызванных натрий-хлоридным засолением [10, 31, 32].

В ответ на засоление в растениях гороха было отмечено увеличение содержания пролина (рис. 4), что свидетельствует об активизации ферментов, участвующих в синтезе пролина, и может сопровождаться подавлением катаболизирующих ферментов. Проллин, играя важную роль в клеточном метаболизме, как в составе белков, так и в качестве свободной аминокислоты, проявляет определенные регуляторные функции во время синтеза белка и действует как сигнальная молекула во время развития растений [36]. Сообщалось о важной роли пролина в росте и жизненном цикле растений путем регуляции генов циклина, общего синтеза белка [23], а также в координации биосинтеза лигнина [37]. В литературе имеются противоречивые сведения о воздействии PGPB на осмотиты разных растений и при разных стресс-факторах. К примеру, инокуляция растений *B. cereus* BST YS1_42 повышала содержание пролина в норме, но приводила к снижению в условиях солевого стресса [10]. Инокуляция нута при солевом стрессе бактериями *B. subtilis* приводила к меньшему содержанию пролина, чем в инокулированных растениях [30]. В инокулированных *B. subtilis* 10-4 растениях гороха в норме концентрация пролина была ниже, чем в неинокулированных (рис. 4). Это может быть связано с расходом пролина для поддержания водного баланса тканей, белкового обмена или синтеза других соединений, вовлеченных в положительную регуляцию роста и развития, а также преадаптацию растений к последующим возможным стрессам, приводящим к водному дефициту. Аналогичные результаты в стрессовых условиях были получены Gupta с соавт. [10], которые продемонстрировали,

что инокуляция *B. cereus* BST YS1_42 и *B. marisfavi* CHR JH 203 предотвращала вызываемое засолением накопление пролина в растениях гороха и оказывала защитный эффект на их рост; тогда как в норме, напротив, наблюдалось увеличение его накопления. Остается спорным вопрос: накопление пролина является симптомом стрессовых повреждений или показателем устойчивости к стрессу [38]. Неоднозначный характер связи между содержанием пролина и стресс-устойчивостью растений может быть обусловлен различной силой стрессовых воздействий в разных экспериментах и сложным взаимодействием пролина с другими стресс-протекторными системами, в частности, с ферментативной антиоксидантной системой [39]. Вероятно, выявленные нами изменения в содержании пролина в предобработанных штаммом 10-4 растениях гороха (рис. 4), наряду с ролью в осморегуляции, могут также принимать участие в защите структур различных биомолекул и мембран или действовать как поглотители свободных радикалов, защищая ДНК от повреждающего действия АФК [38]. Недавно появились сведения о том, что пролин может влиять на рост и развитие растений путем координации с биосинтезом лигнина [37]. Вероятно, выявленное нами в норме снижение содержания пролина в обработанных штаммом 10-4 растениях гороха (рис. 4), может быть связано с его вовлечением в опосредованные эндофитами процессы образования лигнина (рис. 5). Укрепление эндо- и экзодермального апопластических барьеров играет важную роль в защите клеточной стенки растений в целом при стрессах, включая натрий-хлоридное засоление [25]. Среди различных фенольных соединений клетки лигнина отвечает за придание механической прочности и долговечности тканей и важен для правильного роста и развития растений [25, 40] благодаря облегчению тока воды и поддержанию структурной целостности сосудов ксилемы во время стресса. Между тем, компромисс между ростом и защитой растений имеет основополагающее значение для оптимального роста и адаптации растений в меняющейся биотической/абиотической среде. Считается, что этот процесс включает перераспределение ресурсов по разным путям. Часто наблюдалось, что среди вторичных компонентов клеточной стенки изменение биосинтеза лигнина приводит к изменениям как в росте, так и в защите. Однако, как регулируется этот процесс, на сегодняшний день остается в значительной степени неясным и непредсказуемым из-за ограниченного понимания лежащих в их основе механизмов [25]. Имеются единичные сведения о влиянии PGPB на лигнификацию клеток растений. Например, *Pseudomonas aeruginosa* и *B. megaterium* защищали кукурузу от повреждений, вызванных засолением, наряду с усилением роста растений, регулированием содержания воды, по-

вышением содержания фенолов, флавоноидов и антиоксидантных ферментов, также и за счет лигнификации [40]. На примере фасоли была показана способность *B. subtilis* 10-4 повышать солеустойчивость растений, укрепляя клеточные стенки корней через отложение лигнина [4]. Однако сведениями о влиянии эндофитных PGPB на растения гороха в условиях натрий-хлоридного засоления к моменту начала нашей работы мы не располагали. Выявленное существенное усиление лигнификации в клеточных стенках корней гороха при предобработке штаммом 10-4 при засолении (рис. 5) свидетельствует о важном вкладе этих бактерий в укрепление барьерных свойств растений и снижении поступления в них токсических ионов. Кроме того, очевидно, что в выявленное повышение устойчивости проростков гороха к хлориду натрия, индуцированное *B. subtilis*, существенный вклад вносит способность бактерий еще до воздействия стрессора ускорять отложение лигнина в клеточных стенках корней, что, однако, не препятствует проявлению рост-стимулирующего действия этого штамма бактерии в ходе предобработки (рис. 1), вероятно, благодаря способности продуцировать ауксины и другие метаболиты с рост-регулирующими свойствами (табл.1). Кроме того, основываясь на сведениях о способности пролина влиять на рост и развитие растений путем координации с биосинтезом лигнина [37], можно предположить, что выявленное в норме снижение пролина в обработанных штаммом 10-4 растениях гороха (рис. 4) связано с его расходованием бактериями при регуляции образования лигнина (рис. 5). Очевидно, что вовлечение штамма 10-4 в регуляцию образования лигнина вносит важный вклад в защиту растений от осмотических (пролин) (рис. 4) и окислительных (МДА) (рис. 3) повреждений клеток при засолении благодаря корням, имеющим прочный барьер, препятствующий проникновению токсичных ионов в клетки. Эти эффекты, безусловно, требуют дальнейшего тщательного изучения.

В целом, совокупность полученных результатов демонстрирует способность эндофитных бактерий *B. subtilis* 10-4 при предпосевном способе обработки стимулировать ростовые процессы проростков гороха в норме и оказывать протекторный эффект на прорастание и всхожесть семян, а также на рост корней при солевом стрессе. Получены приоритетные данные о важном вкладе *B. subtilis* 10-4 в процесс лигнификации клеточных стенок корней гороха и снижении токсического действия натрий-хлоридного засоления на растения. Это, в свою очередь, отразилось в снижении вызываемых засолением окислительных и осмотических повреждений клеток в предобработанных штаммом 10-4 проростках гороха, о чем судили по содержанию в них МДА и пролина, соответственно. Выявленные свойства бактеризован-

ных растений обеспечивать рост растений в условиях засоления впервые были связаны не только со способностью бактерий продуцировать ауксины и другие регулирующие рост соединения, но и индуцировать в растениях лигнификацию, при которой клеточные стенки получили дополнительную барьерную защиту, а корни продолжили рост при формировании боковых корней. Полученные новые сведения представляют интерес для дальнейшего пристального внимания и углубленных исследований в этом направлении для более полного использования потенциала эндофитных бактерий *B. subtilis* в экологически ориентированных технологиях выращивания гороха, особенно в условиях неблагоприятных стресс-факторов, включая засоление.

Работа выполнена в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования РФ (№ АААА-А21-121011990120-7 и № АААА-А19-119021890030-4) с использованием оборудования Центра коллективного пользования "Агидель" и Уникальных научных установок "Кодинк" Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

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. Mukhopadhyay R., Sarkar B., Jat H.S., Sharma P.C., Bolan N.S. Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security // J. Environ. Manage. 2021. V. 280: e111736. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111736>
2. Isayenkov S.V., Maathuis F.J. Plant salinity stress: many unanswered questions remain // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: e80. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
3. Numan M., Bashir S., Khan Y., Mumtaz R., Shinwari Z.K., Khan A.L., Khan A., AL-Harrasi A. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review // Microbiol. Res. 2018. V. 209. P. 21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
4. Lastochkina O., Aliniaiefard S., Garshina D., Garipova S., Pusenkova L., Allagulova Ch., Fedorova K., Baymieev A., Koryakov I., Sobhani M. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages // J. Plant Physiol. 2021. V. 263: e153462. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153462>
5. Lastochkina O. *Bacillus subtilis*-mediated abiotic stress tolerance in plants // *Bacilli* and agrobiotechnology: phytostimulation and biocontrol / Eds. M.T. Islam et al. Springer. 2019. P. 97. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_6
6. Benedetto N.A., Corbo M.R., Campaniello D., Cataldi M.P., Bevilacqua A., Sinigaglia M., Flagella Z. The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat // AIMS Microbiol. 2017. V. 3. P. 413. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>
7. Abd El-Daim I.A., Bejai S., Fridborg I., Meijer J. Identifying potential molecular factors involved in *Bacillus amyloliquefaciens* 5113 mediated abiotic stress tolerance in wheat // Plant Biol. 2018. V. 20. P. 271. <https://doi.org/10.1111/plb.12680>
8. Abd El-Daim I.A., Bejai S., Meijer J. *Bacillus velezensis* 5113 induced metabolic and molecular reprogramming during abiotic stress tolerance in wheat // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 16282. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52567-x>
9. Blake C., Christensen M.N., Kovács Á. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis* // MPMI. 2021. V. 34. P. 15. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
10. Gupta A., Bano A., Rai S., Kumar M., Ali J., Sharma S., Pathak N. ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in *Pisum sativum* // Biotech. 2021. V. 11: e514. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03047-5>
11. Eichmann R., Richards L., Schäfer P. Hormones as go-betweens in plant microbiome assembly // Plant J. 2021. V. 105. P. 518. <https://doi.org/10.1111/tpj.15135>
12. Shobana N., Sugitha T., Sivakumar U. Plant growth-promoting *Bacillus* sp. cahoots moisture stress alleviation in rice genotypes by triggering antioxidant defense system // Microbiol. Res. 2020. V. 239: e126518. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126518>
13. Barnawal D., Bharti N., Pandey S.S., Pandey A., Chanoitiya C.S., Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria enhances wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and *TaCTR1/TaDREB2* expression // Physiol. Plant. 2017. V. 161. P. 502. <https://doi.org/10.1111/ppl.12614>
14. Lastochkina O., Pusenkova L., Yuldashev R., Babaev M., Garipova S., Blagova D., Khairullin R., Aliniaiefard S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity // Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 121. P. 80. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.020>
15. Vasileva E.N., Akhtemova G.A., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Endophytic microorganisms in fundamental research and agriculture // Ecological Genetics. 2019. V. 17. P. 19. <https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>
16. Pandey P.K., Singh M.C., Singh S.S., Kumar M., Pathak M., Shakywar R.C., Pandey A.K. Inside the plants: endophytic bacteria and their functional attributes for plant growth promotion // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2017. V. 6. P. 11. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.602.002>
17. Haroim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial

- endophytes // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015. V. 79. P. 293.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
18. *Tikhonovich I.A., Andronov E.E., Borisov A.Yu., Dolgikh E.A., Zhernakov A.I., Zhukov V.A., Provorov N.A., Rummyantseva M.L., Simarov B.V.* The principle of complementarity of genomes in expanding the adaptive potential of plants // *Genetics*. 2015. V. 51. P. 973.
<https://doi.org/10.1134/S1022795415090124>
 19. *Vasileva E.N., Akhtemova G.A., Afonin A.M., Borisov A.Yu., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A.* Culturable endophytic bacteria from stems and leaves of garden pea (*Pisum sativum* L.) // *Ecological Genetics*. 2020. V. 18. P. 169.
<https://doi.org/10.17816/ecogen17915>
 20. *Гарипова С.Р., Маркова О.В., Гарифуллина Д.В., Иванчина Н.В., Хайруллин Р.М.* Региональная коллекция бактериальных эндофитов клубеньков бобовых растений как основа создания биопрепаратов для агробиотехнологии // *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*. 2017. Т. 3. С. 56.
 21. *Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Fujita M., Fotopoulos V.* Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator // *Antioxidants*. 2020. V. 9. P. 681.
<https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
 22. *Morales M., Munné-Bosch S.* Malondialdehyde: Facts and Artifacts // *Plant Physiol.* 2019. V. 180. P. 1246.
<https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>
 23. *Kavi K.P.B., Hima K.P., Sunita M.S., Sreenivasulu N.* Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 66: e544.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>
 24. *Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M.A., Iksanova M.A., Kamaletdinova A.A., Lastochkina O.V., Pusenkova L.I.* Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria // *Acta Physiol. Plant.* 2022. V. 44. P. 89.
<https://doi.org/10.1007/s11738-022-03427-1>
 25. *Xie M., Zhang J., Tschaplinski T.J., Tuskan G.A., Chen J.-G., Muchero W.* Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1427.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01427>
 26. *Гарипова С.Р., Маркова О.В., Вахитова Р.К., Гарифуллина Д.В., Каримов И.К., Давлетов Ф.А.* Сравнение морфометрических показателей симбиоза, продуктивности и устойчивости к корневым гнилям и плодовой гниле у усатых и листочковых сортов гороха в условиях Предуралья // *Вестник Башкирского университета*. 2015. Т. 20. С. 460.
 27. *Heath R.L., Packer L.* Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. V. 125. P. 189.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
 28. *Bates L.S., Waldern R.P., Teare D.* Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. P. 205.
<https://doi.org/10.1007/BF00018060>
 29. *Фурцм Г.Г.* Методы анатомо-гистохимических исследований растений. Москва: Наука, 1979. 155 с.
 30. *Abd Allah E.F., Alqarawi A.A., Hashem A., Radhakrishnan R., Al-Huqail A.A., Al-Otibi F.O.N., Malik J.A., Alharbi R.I., Egamberdieva D.* Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms // *J. Plant Inter.* 2018. V. 13. P. 37.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1414321>
 31. *Gupta A., Rai S., Bano A., Khanam A., Sharma S., Pathak N.* Comparative evaluation of different salt-tolerant plant growth-promoting bacterial isolates in mitigating the induced adverse effect of salinity in *Pisum sativum* // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2021. V. 11. P. 13141.
<https://doi.org/10.33263/briac115.1314113154>
 32. *Sofy M.R., Aboeidah A.A., Heneidak S.A., Ahmed H.R.* ACC deaminase containing endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Pisum sativum* through reduced oxidative damage and induction of antioxidative defense systems // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021. V. 28. P. 40971.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-13585-3>
 33. *Tamošiūnė I., Staniėnė G., Haimi P., Stanys V., Ruginius R., Baniulis D.* Endophytic *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. modulate apple shoot growth, cellular redox balance, and protein expression under *in vitro* conditions // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9: e889.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00889>
 34. *Deivanai S., Bindusara A.S., Prabhakaran G., Bhore S.J.* Culturable bacterial endophytes isolated from Mangrove tree (*Rhizophora apiculata* Blume) enhance seedling growth in rice // *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2014. V. 5. P. 437.
<https://doi.org/10.4103/0976-9668.136233>
 35. *Schmid-Siegert E., Loscos J., Farmer E.E.* Inducible malondialdehyde pools in zones of cell proliferation and developing tissues in Arabidopsis // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 8954.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322842>
 36. *Wang G., Zhang J., Wang G., Fan X., Sun X., Qin H., Xu N., Zhong M., Qiao Z., Tang Y., Song R.* Proline responding plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 2582.
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.125559>
 37. *Guan C., Cen H.F., Cui X., Tian D.Y., Tadesse D., Zhang Y.W.* Proline improves switchgrass growth and development by reduced lignin biosynthesis // *Sci. Rep.* 2019. V. 9: e20117.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56575-9>
 38. *Moura J.C.M.S., Bonine C.A.V., Viana J.O.F., Dormelas M.C., Mazzafera P.* Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. P. 360.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>
 39. *Четина О.А., Еремченко О.З., Боталова Е.И., Середина А.М.* Изменение в содержании пролина в растениях при воздействии NaCl-засоления и щелочности корневой среды // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. Т. 6. С. 582.
 40. *Jha Y.* Cell water content and lignification in maize regulated by rhizobacteria under salinity // *Braz. J. Biol. Sci.* 2017. V. 4. P. 9.
<https://doi.org/10.21472/bjbs.040702>

ВЛИЯНИЕ NaCl НА ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ ДЕТЕРГЕНТ-УСТОЙЧИВЫХ МЕМБРАН ХЛОРОПЛАСТОВ И МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ ЭУГАЛОФИТОВ

© 2023 г. В. Н. Нестеров^а, *, Е. С. Богданова^а, О. А. Розенцвет^а

^а Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,
Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук, Тольятти, Россия

*e-mail: nesvik1@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 24.03.2023 г.

Исследовали влияние 1 М NaCl на липидный профиль детергент-устойчивых мембран хлоропластов и митохондрий растений галофитов соленакпливающего типа – *Salicornia perennans* Willd. и *Suaeda salsa* (L.) Pall. (сем. Amaranthaceae). Состав липидов и жирных кислот в детергент-устойчивых мембранах отличается от липидов мембран хлоропластов и митохондрий большим количеством цереброзидов и стериннов. В заданных условиях засоления среды у *S. perennans* происходило многократное увеличение доли цереброзидов в составе детергент-устойчивых мембран хлоропластов, а у *S. salsa* – в детергент-устойчивых мембранах митохондрий. Противоположный эффект наблюдался в отношении стериннов: снижение их относительного содержания при действии соли. Полученные данные свидетельствуют об участии детергент-устойчивых мембран во взаимодействии хлоропластов и митохондрий в клеточном ответе галофитов на засоление.

Ключевые слова: детергент-устойчивые мембраны, липидные рафты, микродомены, митохондрии, хлоропласты, солевой стресс, стеринны, сфинголипиды

DOI: 10.31857/S0015330323600213, **EDN:** WWQCQE

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время произошли существенные изменения в фундаментальных знаниях о строении и функциональной роли мембранных структур клетки. Биологическая мембрана уже не рассматривается как однородный липидный бислой, в который встроены белки – модель, предложенная С. Сингером и Г. Николсоном [1]. В современной интерпретации мембраны представляют собой мозаику дискретных микромоментов [2]. В сравнении с остальными мембранами они отличаются большей стабильностью и плотностью упаковки благодаря специфическому составу липидов [3]. Другое их определение – детергент-устойчивые мембраны (ДУМ, DRM или detergent

resistant membranes) и эта характерная особенность стала основанием для их обнаружения [4]. Известно, что в составе липидов ДУМ преобладают стеринны (Стер), сфинголипиды/цереброзиды (Цер) и глицеролипиды с насыщенными жирными кислотами (ЖК) [5]. Некоторые авторы называют подобные участки мембран липидными рафтами, а липиды ответственные за их образование рафтообразующими [4, 5].

В настоящее время известно, что ДУМ связаны с определенными классами белков и участвуют в широком спектре биологических процессов, таких как рост и морфогенез клеток, мембранная поляризация и ответ на воздействие патогенов [6–8]. Установлено также, что ДУМ повышают стабильность и активность белков, связанных с рецепторной функцией [9], влияют на эффективность транспортеров [10], регулируют функционирование каналов [11], участвуют в белковом обмене [12], растительно-бактериальных взаимодействиях [13], везикулярном транспорте [14], а также в регуляторных процессах [15]. Присутствие ДУМ в настоящее время установлено в разных типах мембран – плазмалемме, вакуоли, ап-

Сокращения: ГИФЦ – гликозилинозитолфосфорилцерамид; ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин; ДУМ – детергент-устойчивые мембраны; ДФГ – дифосфатидилглицерин; ЖК – жирные кислоты; ИН – индекс двойной связи; С18:3 – линоленовая ЖК; С18:2 – линолевая ЖК; МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин; С18:1 – олеиновая ЖК; С16:0 – пальмитиновая ЖК; С18:0 – стеариновая ЖК; Стер – стеринны; СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицерин; ТСХ – тонкослойная хроматография; ФИ – фосфатидилинозит; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; Цер – цереброзиды.

парате Гольджи, эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях, хлоропластах [15–17].

Количество и размер ДУМ, а также их состав, зависят от многих факторов, включая видовые особенности организма, тип ткани, клеточную топологию мембран. При этом структурные и функциональные параметры ДУМ могут меняться при стрессовых воздействиях, например, при холодом [18] или патогенном воздействии [19]. Однако роль ДУМ в условиях солевого стресса неизвестна.

Поступление ионов в растительную клетку осуществляется с помощью ионных каналов [20] и транспортеров, локализованных в мембранах [21]. Механизмы адаптации растений к засолению, связанные с мембранами, наиболее развиты в галофитах соленакапливающего типа (эугалофитах) [22]. Протеомным анализом установлено, что в транспорте ионов Na^+ эугалофитов задействовано как минимум три типа клеточных мембран: плазмалемма, тонопласт и хлоропласты [21]. Показано также, существование ионопроводящих путей в митохондриях [23].

Хлоропласты и митохондрии в растительных клетках служат основными внутриклеточными центрами, которые снабжают клетку энергией посредством деятельности дыхательных и фотосинтетических цепей, локализованных на мембране. Хорошо известно, что обе органеллы взаимосвязаны метаболическими путями. Например, они играют центральную роль в метаболизме углерода и азота, синтезе кофакторов FeS и ЖК и др., что предполагает их обширное взаимодействие [24].

Мембраны хлоропластов и митохондрий имеют специфичный набор липидов. Тилакоидная мембрана содержит моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ), серосодержащий липид сульфохиновозилдиацилглицерин (СХДГ) и фосфатидилглицерин (ФГ) [25]. Митохондриальные мембраны растений имеют два преобладающих класса липидов – фосфатидилхолин (ФХ) и фосфофатидилэтаноламин (ФЭ). Кроме того, в липидах мембран митохондрий присутствуют ФГ, фосфатидилинозит (ФИ), и специфичный для митохондрий дифосфатидилглицерин (ДФГ) [26]. Строго определенный состав липидов в мембранах хлоропластов и митохондрий обеспечивает их целостность и функциональную активность интегральных белков, вовлеченных в ионное гомеостатирование, фотохимические и электрон-транспортные цепи и др. процессы. Ранее мы обнаружили наличие ДУМ в мембранах хлоропластов и митохондрий в листьях эугалофита *Salicornia perrenans* и гликогалофита *Artemisia santonica* [27]. Состав липидов, отвечающих за формирование рафтов зависел от способа регуляции солевого обмена у исследованных галофитов. При этом вопрос о роли липидов ДУМ в ответ на солевой стресс остался открытым.

Цель данной работы – изучить состав липидного профиля ДУМ хлоропластов и митохондрий у растений соленакапливающего типа в ответ на увеличение уровня засоления среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве объекта исследования выбраны однолетние эугалофиты *S. perennans* Willd. и *Suaeda salsa* (L.) Pall. (сем. Amaranthaceae). Семена дикорастущих растений отбирали в конце октября 2020 г. в районе Приэльтонья (49°07' с.ш., 46°50' в.д.) и хранили при комнатной температуре в течение 6 мес.

Модельный эксперимент. Семена проращивали в течение одного–двух дней на дистиллированной воде в чашках Петри при температуре 22–24°C и высевали в сосуды с песком. Полив осуществляли питательным раствором Робинсона (6 мМ KNO_3 , 4 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 мМ MgSO_4 , 1 мМ KH_2PO_4 , 50 мкМ $\text{FeNa}(\text{ЭДТА})_2$, 50 мкМ H_3BO_3 , 10 мкМ MnCl_2 , 1 мкМ ZnSO_4 , 0.5 мкМ CuSO_4 , 0.1 мкМ Na_2MoO_4) [28]. Растения выращивали при температуре воздуха 20–22°C, освещенности – 1200 мкмоль/м² с, фотопериоде – 10 ч в течение трех месяцев. Затем растения разделяли на две группы: контроль и опыт (NaCl). В сосуды с опытными растениями однократно вносили раствор, содержащий 1 М NaCl до полной влагоемкости почвы, и выдерживали одни сутки. Надземную часть растений срезали и формировали три биологические пробы на каждый из вариантов опытов. Из каждой биологической пробы выделяли фракции хлоропластов и митохондрий, которые подвергали действию детергента с последующим выделением ДУМ.

Выделение хлоропластов и митохондрий. Фракции, обогащенные хлоропластами и митохондриями, выделяли методом дифференциального центрифугирования [29]. Листья растений гомогенизировали при +4°C в 15 мл среды, содержащей 0.5 М сахарозы, 5 мМ ЭДТА, 5 мкМ b-меркаптоэтанола и 50 мМ Трис-НСl (pH 7.8) в расчете на 10 г биомассы. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 3500 g [27]. Осадок использовали для получения фракции хлоропластов, а супернатант – для фракции митохондрий. Осадок, содержащий фракцию хлоропластов, подвергали двукратной седиментации для получения очищенных хлоропластов.

Супернатант первой стадии центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин для выделения фракции митохондрий. Полученный осадок ресуспендировали в среде, содержащей 0.5 М сахарозы и 5 мМ Трис-НСl (pH 7.2), и центрифугировали при 15000 g (при +4°C) в течение 15 мин для получения очищенных митохондрий. В отдельных случаях чистоту фракций проверяли с помощью электронной микроскопии, фиксируя материал в 3.5% рас-

творе глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН 7.4).

Изоляция ДУМ. Для получения ДУМ применяли модифицированный метод, используемый для выделения липидных рафтов из митохондрий [30]. Для этого полученные фракции органелл (~3 мг белка) солубилизировали в 1 мл буфера, содержащего 1% тритона X-100, 10 мМ Трис-НСl, 5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 1 М сахарозы, 1 мМ фенол-метилсульфонил фторида (рН 7.5) в течение 30 мин при +4°C. Полученную суспензию переносили в центрифужную пробирку и последовательно насливали сахарозу в концентрациях 35% (1 мл), 25%, 15%, 5% (по 2 мл, соответственно). Центрифугирование осуществляли при 200 000 g в течение 30 мин на препаративной ультрацентрифуге UP-65 ("MLW", Германия). ДУМ наблюдали в виде зоны опалесценции в области 15% градиента плотности сахарозы.

Экстракция и анализ липидов. Липиды из мембран хлоропластов и митохондрий и их ДУМ экстрагировали смесью хлороформ/метанол 1 : 2 (об/об) [29]. Экстракт массой 1–5 мг отмывали от не липидных примесей, растворитель удаляли на ротонном испарителе. Фосфолипиды и Цер разделяли методом двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах с силикагелем 5 × 5 см ("Sorbfil", Россия) с использованием систем растворителей: хлороформ : метанол : бензол : 28% аммиак (130 : 60 : 20 : 12, (об/об), первое направление); и хлороформ : метанол : бензол : уксусная кислота (140 : 60 : 20 : 10 : 8 (об/об); второе направление). Гликолипиды разделяли методом одномерной ТСХ на пластинах 10 × 10 см ("Sorbfil", Россия) в системе растворителей: ацетон : бензол : вода 91 : 30 : 8 (об/об). Стер анализировали методом ТСХ на пластинах 10 × 10 см ("Sorbfil", Россия) с использованием последовательной системы растворителей : толуол : гексан : муравьиная кислота (140 : 60 : 1 (об/об); первое направление); гексан : диэтиловый эфир : муравьиная кислота (60 : 40 : 1 (об/об); второе направление). Визуализацию липидов проводили опрыскиванием пластин 10% H₂SO₄ в метаноле с последующим прогревом в течение 15 мин при 180°C. Количество липидов определяли денситометрически с помощью программы ДенСкан ("Ленхром", Россия). Хроматограммы анализировали в режиме параболического приближения по калибровочным кривым. МГДГ, ФХ, сфингомиелин, холестерин ("Sigma", Германия) использовали в качестве стандартов для калибровочных графиков. В ряде случаев результаты анализа подтверждали на спектрофотометре PE-3000 УФ ("PromEco-Lab", Россия).

Анализ ЖК осуществляли в виде их метиловых эфиров. Метилирование проводили путем кипячения экстракта липидов в 5% растворе HCl в ме-

таноле в течение 1 ч. После охлаждения полученные эфиры экстрагировали гексаном и очищали с помощью ТСХ. Метиловые эфиры анализировали на газовом хроматографе ("Хроматэк Кристалл 5000.1" Россия) в изотермическом режиме с использованием капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0.25 мм ("Restek", США). Температура колонки – 180°C, испарителя и детектора – 260°C, скорость тока газа-носителя (гелий) – 2 мл/мин.

Индекс ненасыщенности ЖК (ИН), характеризующий степень ненасыщенности липидов, рассчитывали по формуле:

$$\text{ИН} = ((M \times 1) + (Ди \times 2) + (Три \times 3))/100, \text{ где}$$

M – сумма моноеновых ЖК, Ди – сумма диеновых ЖК и Три – сумма триеновых ЖК, выраженных в % от общей суммы ЖК [31].

Опыты проводили в трехкратной биологической повторности. Анализ каждого компонента проводили трижды в каждой биологической пробе. Данные в рисунках и таблицах представляют собой средние значения ± стандартные ошибки. Сравнение данных проводилось двухфакторным дисперсионным анализом (Two-way ANOVA) с последующим использованием критерия Тьюки. Разные буквы указывают на различия между образцами ($P < 0.05$). Расчеты выполняли, используя программы Statistica 10.0 for Windows, Microsoft Excel 2007, Past 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание общих и рафтообразующих липидов в мембранах хлоропластов и митохондрий и их ДУМ

Для изучения формирования ДУМ в клетках галофитов были проведены модельные эксперименты с использованием двух видов *S. perennans* и *S. salsa*, выращенных на питательной среде Робинсона с последующим воздействием NaCl. Микродомены, устойчивые к детергенту, выделяли из опалесцирующих зон в области 15% градиента сахарозы после дифференциального центрифугирования.

Количество липидов, экстрагированных из мембран хлоропластов, у двух видов растений без воздействия NaCl не различалось и составляло около 10 мг/г сухой массы (рис. 1а). В отличие от хлоропластов в мембранах митохондрий содержание липидов у *S. salsa* было в два раза выше, чем у *S. perennans*. Действие NaCl приводило к двукратному увеличению количества липидов в мембранах хлоропластов *S. salsa* и 1.5-кратному увеличению количества липидов в мембранах митохондрий *S. perennans* (рис. 1а, б). Суммарное содержание рафтообразующих липидов (Цер + Стер) в мембранах хлоропластов у *S. perennans* составляло 8.5–10% до и после воздействия соли, а у *S. salsa* – 4.5–

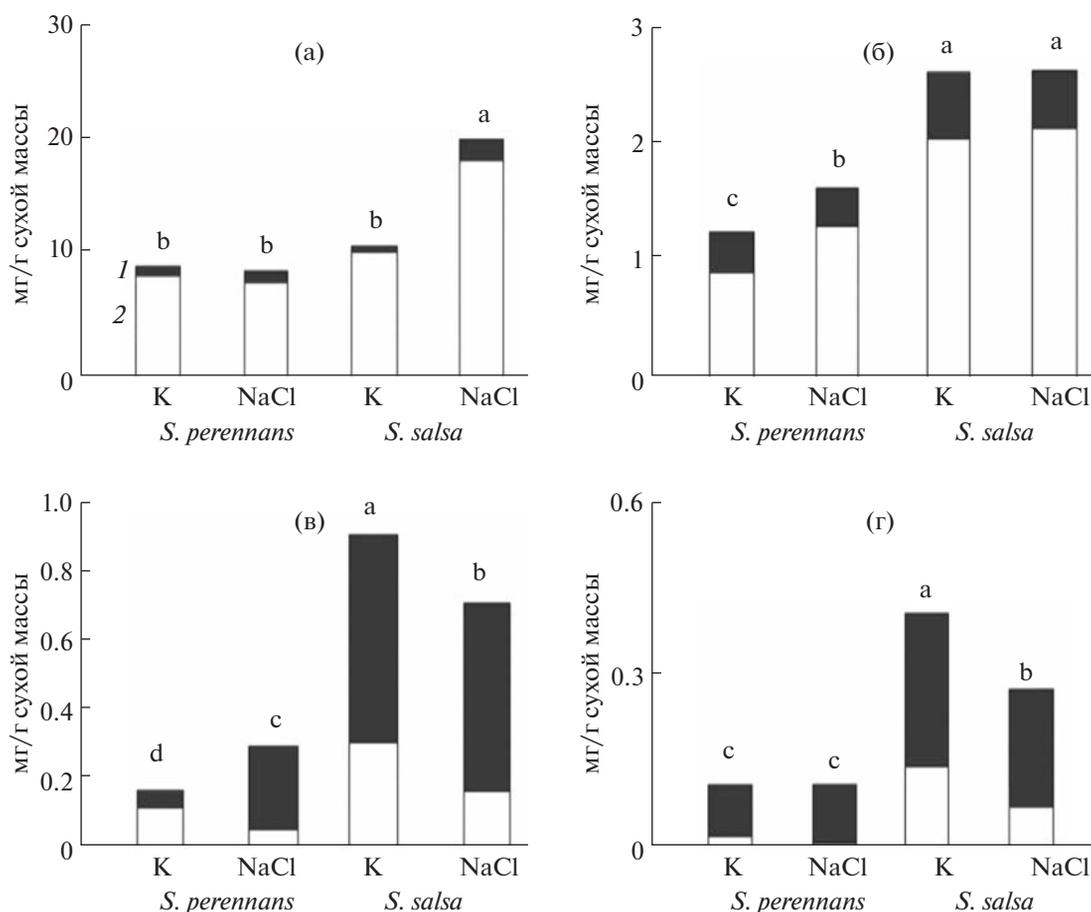


Рис. 1. Содержание суммарных и рафтообразующих липидов в мембранах хлоропластов (а) и митохондрий (б) и их ДУМ (в, г, соответственно) при влиянии 1 М NaCl. 1 – рафтообразующие липиды, 2 – мембранные липиды, К – контроль. Разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

8.8% (рис. 1а). В мембранах митохондрий содержание этих групп липидов было выше в 2–3 раза, чем в хлоропластах. Под действием соли содержание Цер + Стер снижалось у обоих видов (с 27.3 до 19.8% и с 22 до 18%, соответственно) (рис. 1б).

Сумма липидов, выделенных из ДУМ хлоропластов *S. perennans*, не превышала 2% от липидов мембран хлоропластов до воздействия NaCl. ДУМ хлоропластов *S. salsa* отличались большим содержанием липидов (8% от суммы) по сравнению с *S. perennans* (рис. 1в). Под действием NaCl общее количество липидов ДУМ у *S. perennans* увеличивалось в 1.6 раза, а у *S. salsa* снижалось в 1.3 раза. Одновременно с этим увеличивалась доля рафтообразующих липидов, особенно в ДУМ *S. perennans* (почти в три раза).

Еще меньшее количество липидов было выделено из ДУМ митохондрий (рис. 1г). Причем рафтообразующие липиды в них доминировали как до воздействия NaCl, так и после него. Также как в случае с хлоропластами, ДУМ митохондрий *S. salsa* характеризовались большей концентрацией липидов по сравнению с *S. perennans* (рис. 1г).

Действие NaCl приводило к небольшому увеличению доли рафтообразующих липидов в ДУМ митохондрий у обоих видов.

Состав индивидуальных классов липидов в мембранах хлоропластов и митохондрий и их ДУМ

Более подробный анализ состава липидов показал, что главными липидами хлоропластов обоих видов галофитов были МГДГ и ДГДГ, а доля рафтоспецифичных липидов Цер и Стер у *S. perennans* составляла 8 и 1% от суммы липидов, а у *S. salsa* 2 и 1%, соответственно (рис. 2а, б). Под действием NaCl наблюдали снижение относительного вклада гликолипидов, главным образом МГДГ. При этом у *S. salsa* обнаружено небольшое увеличение доли фосфолипидов. Содержание Цер в мембранных липидах увеличивалось у обоих видов.

Кардинально другая картина наблюдалась в составе липидов ДУМ хлоропластов. До воздействия соли в их составе по-прежнему доминировали гликолипиды (рис. 2в, г). Их суммарное содержание составляло 68 и 75% у *S. perennans* и *S. salsa* соответ-

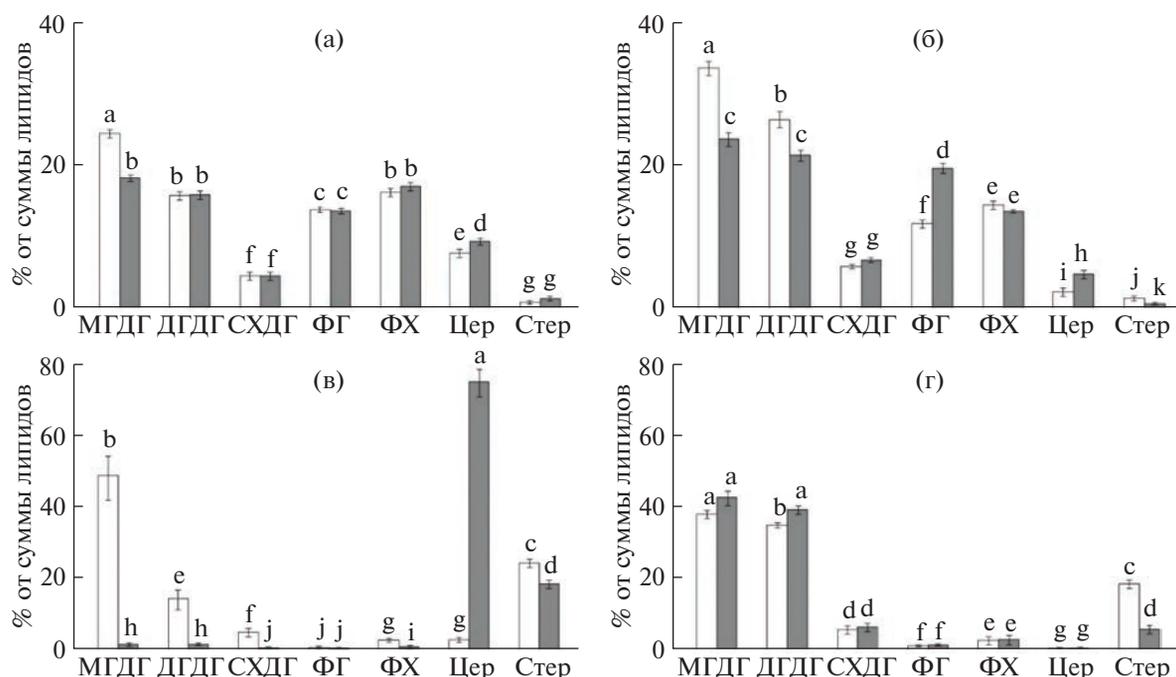


Рис. 2. Влияние 1 М NaCl на состав индивидуальных классов липидов в мембранах и ДУМ хлоропластов *S. perennans* (а, в) и *S. salsa* (б, г). 1 – контроль, 2 – NaCl. Цер и Стер – рафтообразующие липиды. Разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

ственно. Второе место по вкладу в состав липидов принадлежало сумме компонентов, ответственных за образование рафтов – Стер и Цер, а вклад фосфолипидов не превышал 5%. Среди фосфолипидов ДУМ доминировали ФГ и ФХ. В ответ на действие NaCl у *S. perennans* на фоне многократного увеличения содержания Цер уменьшалось содержание МГДГ и ДГДГ – в 10 и в 4 раза, соответственно, а также содержание Стер (рис. 2в). В отличие от *S. perennans* в ДУМ хлоропластов *S. salsa* при действии NaCl вклад гликолипидов и фосфолипидов, а также Цер практически не менялся, но уменьшалось содержание Стер относительно других групп липидов (рис. 2г). При этом если у *S. perennans* доля Стер снижалась на 20%, то у *S. salsa* – на 68% в сравнении с контролем. Судя по сумме Стер + Цер, хлоропластные ДУМ у *S. perennans* оказались более чувствительными к засолению, чем у *S. salsa*.

Липиды в мембранах митохондрий обоих видов в целом имели схожий состав и одинаковый характер изменений под действием NaCl (рис. 3а, б), но количество рафтообразующих липидов (Стер и Цер) в них до воздействия NaCl было выше, чем в хлоропластах. В их составе идентифицированы ФХ, ФЭ и маркерный для данной органеллы липид ДФГ. Кроме того, среди липидов митохондрий у обоих видов растений содержание гликолипида ДГДГ составляло 10–15%.

В липидном профиле ДУМ как в отсутствие NaCl, так и под ее воздействием, рафтообразующие липиды становятся главными липидами. Однако у *S. perennans* эту роль на 90% выполняли Стер, содержание которых под действием NaCl практически не менялось. В свою очередь суммарное содержание Цер и Стер у *S. salsa* составляло около 70%, но под действием NaCl доля Цер увеличивалась в 8 раз по сравнению с контролем, а доля Стер снижалась (рис. 3в, г). Общее содержание фосфолипидов в ДУМ митохондрий у *S. perennans* было очень низким не более 1% от суммы мембранных липидов. В то же время ДУМ *S. salsa* в отсутствие соли имели более высокое содержание фосфолипидов, главным образом, за счет ФХ (20%) (рис. 3г). Под влиянием NaCl содержание ФХ снижалось практически вдвое у этого вида растений.

Состав ЖК липидов ДУМ хлоропластов и митохондрий

Не менее значимые результаты получены при анализе состава ЖК в липидах ДУМ. В мембранах хлоропластов двух видов галофитов содержание ненасыщенных ЖК составляло более 80%, большая часть из которых представлена линоленовой кислотой (С18:3) (данные не приводятся). Под действием NaCl в составе главных ЖК в липидах мембран хлоропластов каких-либо изменений не обнаружено.

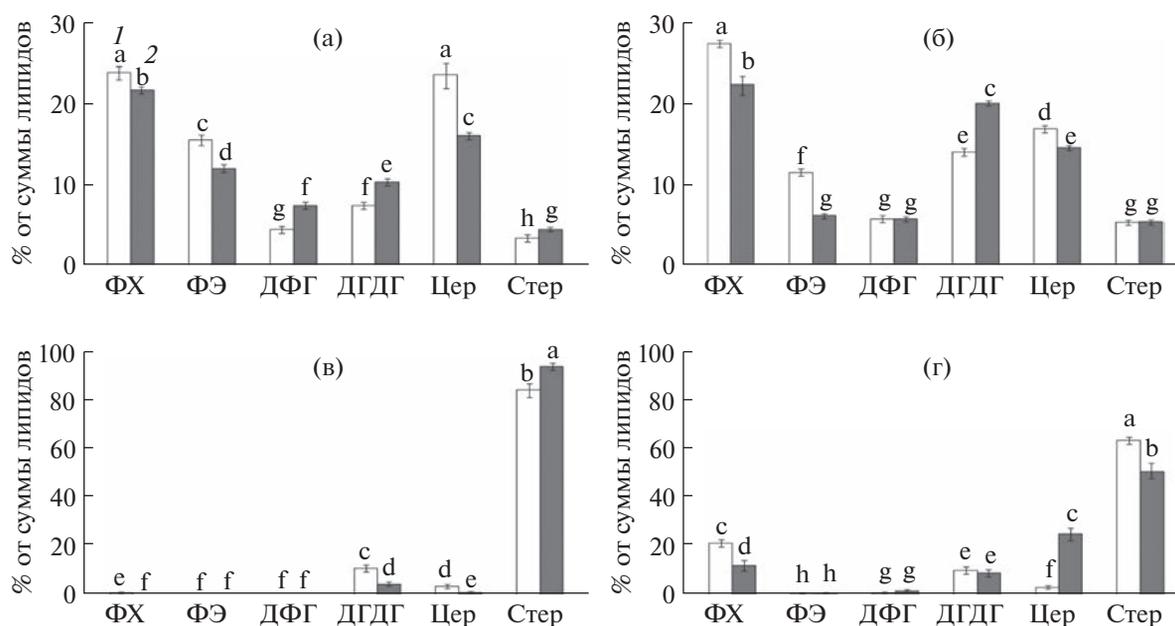


Рис. 3. Влияние 1 М NaCl на состав индивидуальных классов липидов в мембранах митохондрий *S. perennans* (а) и *S. salsa* (б) и их ДУМ (в, г). 1 – контроль, 2 – NaCl. Цер и Стер – рафтообразующие липиды. Разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

Другая картина наблюдается в ДУМ, выделенных из мембран хлоропластов. В контрольных растениях обнаружено высокое содержание пальмитиновой кислоты (С16:0): в ДУМ хлоропластов *S. salsa* – 45.7%, а у *S. perennans* – 34.1% от суммы ЖК (табл. 1). Под действием NaCl концентрация С16:0 увеличивалась, но только у *S. perennans* и становилась равной 40.3% от суммы ЖК. В опытных растениях *S. salsa* под действием NaCl увеличивалось относительное содержание стеариновой кислоты (С18:0) с 7.7 до 9.7%. У растений *S. perennans*, как в контроле, так и при добавлении NaCl в корнеобитаемую среду, была отмечена низкая концентрация С18:3 – не более 1.5% от суммы ЖК. В тоже время у двух видов эугалофитов под действием NaCl содержание ненасыщенных ЖК либо не менялось, как в случае с линолевой кислотой (С18:2), либо снижалось – в случае с олеиновой кислотой (С18:1).

Как в контрольных, так и в опытных вариантах липиды ДУМ митохондрий *S. perennans* и *S. salsa* обогащены кислотой С18:1 по сравнению с ДУМ хлоропластов (табл. 1, 2). Кроме того, у *S. perennans* под действием NaCl концентрация С18:2 увеличивалась, а насыщенных кислот – С16:0 и С18:0 – не менялась (табл. 2). В ДУМ митохондрий *S. salsa* напротив, увеличивалась концентрация насыщенных ЖК С18:0 и С16:0, тогда как снижалась концентрация всех ненасыщенных ЖК. Также в ДУМ митохондрий двух видов выявлено низкое содержание С18:3 – не более 10% от суммы ЖК.

В целом реакция ДУМ митохондрий у *S. salsa* на NaCl была более выраженной и комплексной – было выявлено снижение в 1.5 раза уровня ННЖК и повышение НЖК в 1.2 раза. Соответственно ненасыщенность ЖК липидов ДУМ митохондрий у *S. salsa* снизилась на 43% после воздействия NaCl.

ОБСУЖДЕНИЕ

В модельных экспериментах изучено формирование ДУМ в хлоропластах и митохондриях двух видов солеустойчивых растений *S. perennans* и *S. salsa*. Оба вида являются эугалофитами суккулентного типа и способны выдерживать высокие концентрации солей без ущерба для фотосинтеза [32]. Используемая нами концентрация 1 М NaCl не является оптимальной для роста растений. Однако ее применение в течение 1 сут не вызывало внешних симптомов повреждения, что, по-видимому, не приводило к нарушению физиологических реакций на солевой стресс [33]. Чтобы получить более полное представление о липидах, необходимых для образования микромоменов, мы выделили фракции хлоропластов и митохондрий, а также области мембран, устойчивых к детергенту из этих органелл. Наличие ДУМ у хлоропластов и митохондрий, как контрольных растений, так и подверженных воздействию NaCl, свидетельствует о том, что ДУМ являются конститутивным признаком исследованных галофитов. Идентификация молекулярных компонентов этих ДУМ показала, что их липидный состав значительно отличается

Таблица 1. Влияние 1 М NaCl на состав ЖК липидов ДУМ хлоропластов *S. perennans* и *S. salsa*, % от суммы ЖК

ЖК	Виды			
	<i>S. perennans</i>		<i>S. salsa</i>	
	контроль	NaCl	контроль	NaCl
<C14:0	1.9 ± 0.2a	1.8 ± 0.1a	1.9 ± 0.1a	1.3 ± 0.1b
C14:0	6.2 ± 0.5a	5.5 ± 0.5a	2.9 ± 0.3b	3.9 ± 0.2c
C15:0	2.4 ± 0.1a	2.3 ± 0.1a	0.3 ± 0b	0.8 ± 0c
C16:0	34.1 ± 2.9b	40.3 ± 3.2ab	45.7 ± 4.3a	44.9 ± 3.7a
C16:1	7.2 ± 0.6a	5.3 ± 0.5b	0.6 ± 0c	1.6 ± 0.1d
C17:0	0.8 ± 0a	0.8 ± 0.1a	0.2 ± 0b	0.3 ± 0.1b
C17:1	0.6 ± 0a	0.4 ± 0b	0.4 ± 0.1b	0.1 ± 0c
C18:0	13.1 ± 0.8a	12.8 ± 1.1a	7.7 ± 0.5b	9.7 ± 0.4c
C18:1	15.4 ± 1.5a	14.5 ± 1.0a	13.6 ± 1.4a	8.7 ± 0.9b
C18:2	5.7 ± 0.3a	5.6 ± 0.2a	6.0 ± 0.4a	6.4 ± 0.6a
C18:3	0.7 ± 0a	1.4 ± 0.1b	18.0 ± 0.5c	18.9 ± 1.9c
C20:0	0.5 ± 0a	0.5 ± 0.1a	1.4 ± 0.1b	1.2 ± 0.1b
>C20:0	6.5 ± 0.4a	7.8 ± 0.6b	0.9 ± 0.2c	1.8 ± 0.1d
X	4.9 ± 0.5a	1.0 ± 0.1b	0.4 ± 0c	0.4 ± 0c
ИН	0.4	0.4	0.8	0.8
Σ МЖК	23.2	20.2	14.6	10.4
Σ НЖК	57.1	62.2	58.2	60.8
Σ ННЖК	29.6	27.2	38.6	35.7

Примечание. Разные буквы указывают на разницу между образцами ($P < 0.05$). X – сумма неидентифицированных ЖК, ИН – индекс ненасыщенности ЖК, МЖК – сумма C16:1, C17:1 и C18:1, НЖК – сумма насыщенных ЖК, ННЖК – сумма ненасыщенных ЖК.

Таблица 2. Влияние 1 М NaCl на состав ЖК липидов ДУМ митохондрий *S. perennans* и *S. salsa*

ЖК	ЖК, % от суммы			
	<i>S. perennans</i>		<i>S. salsa</i>	
	контроль	NaCl	контроль	NaCl
<C14:0	3.4 ± 0.2a	1.1 ± 0.1b	1.9 ± 0.2c	1.6 ± 0.2c
C14:0	6.7 ± 0.5a	4.3 ± 0.4b	4.6 ± 0.5bc	5.3 ± 0.5c
C15:0	2.4 ± 0.2a	2.0 ± 0.2a	1.2 ± 0.1b	1.7 ± 0c
C16:0	35.9 ± 2.4a	31.1 ± 2.5a	39.6 ± 2.0a	44.1 ± 2.2b
C16:1	7.9 ± 0.5a	6.0 ± 0.4b	3.1 ± 0.2c	2.4 ± 0.2d
C17:0	0.6 ± 0a	0.6 ± 0a	0.4 ± 0b	0.7 ± 0c
C17:1	0.7 ± 0a	0.8 ± 0.1a	–	–
C18:0	11.7 ± 1.1a	12.3 ± 0.8a	8.4 ± 0.6b	13.9 ± 1.2a
C18:1	16.0 ± 1.4a	18.4 ± 1.8a	18.0 ± 1.5a	12.2 ± 1.2b
C18:2	7.9 ± 0.7a	14.0 ± 1.2b	9.7 ± 1.0c	6.7 ± 0.7a
C18:3	0.8 ± 0a	0.7 ± 0.1a	9.6 ± 0.9b	4.9 ± 0.5c
C20:0	0.5 ± 0c	0.3 ± 0b	0.6 ± 0.1ac	0.8 ± 0.1a
>C20:0	4.9 ± 0.4a	4.4 ± 0.3a	2.3 ± 0.2b	4.2 ± 0.3a
X	0.6 ± 0a	4.0 ± 0.2b	0.6 ± 0a	1.5 ± 0.1c
ИН	0.4	0.5	0.7	0.4
Σ МЖК	24.6	25.2	21.1	14.6
Σ НЖК	57.8	50.6	54.8	66.5
Σ ННЖК	33.3	39.9	40.4	26.2

Примечание. Разные буквы указывают на разницу между образцами ($P < 0.05$). X – сумма неидентифицированных ЖК, ИН – индекс ненасыщенности ЖК, МЖК – сумма C16:1, C17:1 и C18:1, НЖК – сумма насыщенных ЖК, ННЖК – сумма ненасыщенных ЖК.

от такового для фракций хлоропластов и митохондрий. Обогащение липидов Стер, Цер и насыщенными ЖК, как и следовало ожидать, является главным признаком, отличающим ДУМ от мембран митохондрий и хлоропластов соответствующих органелл. Аналогичные исследования, проведенные на растениях *Arabidopsis thaliana* и *Allium porrum*, показали 4-, 5-кратное увеличение количества Цер в ДУМ по сравнению с мембранами плазмалеммы, микросомальных мембран и мембран Гольджи [3, 7].

Как показали наши исследования, под действием NaCl менялся количественный состав рафтообразующих липидов. Характер изменений зависел, прежде всего, от видовых особенностей галофитов. Наиболее значимые изменения в составе рафтообразующих липидов в ДУМ хлоропластов отмечены у *S. perennans*, а в ДУМ митохондрий – у *S. salsa*. Это подтверждает сделанный нами ранее вывод о том, что разные виды растений, даже близкие между собой по степени солеустойчивости, могут иметь свои особенности организации фотосинтетического аппарата, транспорта ионов и метаболической активности [27]. Так растения вида *S. perennans* имеют недифференцированную по форме клеток хлоренхимы в фотосинтезирующих органах. Внутренняя архитектура листа вида *S. salsa* характеризуется четким разделением тканей на палисадный и губчатый мезофилл, которые содержат более крупные клетки по сравнению с *S. perennans* [34]. В клетках *S. perennans* обнаружено вдвое большее число хлоропластов, чем у *S. salsa*. Все это могло отразиться на структурной организации мембран и ДУМ в хлоропластах [34].

Относительно митохондрий известно, что митохондриальная среда динамически модулируется посредством метаболических взаимодействий и окислительно-восстановительного обмена с хлоропластами. Особенно, когда растения подвергаются сильному стрессу [24]. Эти эффекты, по-видимому, в большей степени отразились на ДУМ митохондрий *S. salsa*.

Одновременно с этим наши результаты показали существование перекрестного взаимодействия между хлоропластами и митохондриями на основе разнонаправленного характера изменений рафтообразующих липидов. В ДУМ хлоропластов и митохондрий растений обоих видов до воздействия NaCl среди рафтообразующих липидов доминируют Стер, затем следуют Цер и глицеролипиды. При действии NaCl в ДУМ мембран хлоропластов и митохондрий роль Цер усиливалась, поскольку их количество претерпело большие изменения по сравнению со Стер. При этом отмечено, что под действием NaCl в ДУМ хлоропластов у *S. perennans* доля Цер увеличивалась, а в митохондриях уменьшалась. Напротив, у

S. salsa в ДУМ митохондрий доля Цер увеличивалась, а в ДУМ хлоропластов не менялась. По-видимому, микродомены осуществляют координацию взаимодействия хлоропластов и митохондрий путем обмена рафтообразующими липидами.

ДУМ тесно связаны с физиологическими функциями мембран и ответом на различные стрессовые воздействия. Например, изменения соотношения Стер и Цер при холодной акклиматизации приводило к изменениям термодинамических свойств и физиологических функций микродоменов, что, в свою очередь, влияло на устойчивость растений к низким температурам [18]. Однако выполняемые при этом роли Стер и Цер, по-видимому, различны. Цер являются растительными сфинголипидами, включающими сфингоидную основу, длинноцепочечные насыщенные ЖК и углеводный фрагмент [7]. Они обладают высоким сродством к Стер, обусловленным взаимодействием боковых цепей Стер с насыщенными алкильными цепями сфинголипидов. Это позволяет им создавать плотную упаковку и облегчает образование липидных микродоменов. Данные о роли Цер в липидных рафтах немногочисленны. Известно, что Цер вовлечены в клеточную сигнализацию, процесс апоптоза, реакции растений на охлаждение, гипоксию и патогены [18, 35]. Они составляют около 40% от общего количества липидов в плазматической мембране растений [36]. В аппарате Гольджи, ЭПР, тонопласте доля Цер составляет от 7 до 30% в зависимости от вида растения и типа органов [5]. Однако их биосинтез напрямую связан с метаболическими реакциями, происходящими в хлоропластах [35]. Кроме того, нарушение синтеза Цер в растительной клетке может приводить к изменению ультраструктуры хлоропластов и к деградации фотосинтетических пигментов [37]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что Цер концентрируются именно в микродоменах мембран, устойчивых к действию детергента.

Цер, участвующие в формировании микродоменов, могут способствовать аккумуляции определенных белков в упорядоченной фазе мембраны. Например, при изучении солеустойчивости *A. thaliana* были получены мутанты, дефектные по основным ранним событиям передачи сигналов соли, и выделен мутант *Moca1* с повышенной чувствительностью к солевому стрессу [38]. Липидным анализом установлено, что специфичные для растений гликозилинозитолфосфорилцерамиды (ГИФЦ) участвуют в восприятии сигнала плазматической мембраной ионного стресса. Авторы заключили важность ГИФЦ – как особого класса сфинголипидов – для регуляции (и модуляции) сигнальных процессов на плазматической мембране, связанных с засолением. Наши результаты позволяют предположить, что, увеличение концентрации Цер в ДУМ хлоропластов и мито-

хондрий способствует реализации сигнальной функции этих доменов у галофитов в ответ на солевой стресс.

Мембранные Стер рассматриваются как одно из ключевых звеньев регуляции ионной проницаемости растительных мембран. При действии ни-статина, специфически связывающегося со Стер, наблюдали значительное увеличение мембранной проводимости для воды, ионов калия, а также усиление потребления клетками кислорода и увеличения скорости тепловыделения [19]. Благодаря наличию тетрациклического стеранового кольца, Стер представляют гидрофобное ядро, внедренное в алифатические цепи ЖК в бислойной мембране. Наряду со структурной ролью Стер выполняют важные регуляторные функции. Как предшественники растительных гормонов они участвуют в регуляции роста и развития растений [39].

По общим оценкам содержание Цер вместе со свободными Стер может составлять 20–40% от общего содержания липидов в ДУМ [3, 5]. Как показали наши эксперименты, эта величина в ДУМ может достигать 75–90%. При этом пути биосинтеза Стер и Цер пересекаются. Так, ингибирование функционирования фермента HMGR, определяющего запуск биосинтеза Стер у растений *A. thaliana*, приводило к снижению не только активности HMGR и подавлению синтеза Стер, но и к снижению содержания Цер [40].

В отношении ЖК – еще одного критерия, характеризующего ДУМ, следует отметить, что их состав находился в большей зависимости от вида растений, от локализации ДУМ в эндо- и мембранах и в меньшей степени от влияния засоления. Общая тенденция в изменении состава ЖК под действием NaCl – увеличение уровня насыщенных ЖК и изменение соотношения ненасыщенных ЖК в сторону снижения полиненасыщенности. Синтез ЖК, также как синтез Стер и Цер, требует тесной координации между пластидами и экстрапластидными мембранами. По-видимому, микродомены на мембранах органелл, имеют решающее значение для их взаимодействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были обнаружены ДУМ в хлоропластах и митохондриях однолетних эу-галлофитов *S. perennans* и *S. salsa* как в контроле, так и при воздействии NaCl. Состав липидов и ЖК в ДУМ отличается от липидов мембран хлоропластов и митохондрий. Изменение состава рафтообразующих липидов – Стер и Цер – свидетельствует об участии этих структур в ответе на действие NaCl. Характер изменений зависел от состава рафтообразующих липидных молекул, внутриклеточной локализации мембран и видовых особенностей

растительного объекта. Многократное увеличение доли Цер в ДУМ хлоропластов у *S. perennans* и в ДУМ митохондрий у *S. salsa* при засолении среды доказывает участие этого типа липидов в клеточном ответе галофитов на засоление. Противоположный эффект наблюдался в отношении Стер: снижение их относительного содержания при действии соли. В целом наши данные говорят о том, что у галофитов, кроме известных механизмов солеустойчивости, существует набор дополнительных хорошо организованных и взаимодополняющих клеточных механизмов для борьбы со стрессом, вызванным NaCl.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ темы 1021060107217-0-1.6.19).

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. Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Sci.* 1972. V. 175. P. 720. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
2. Nickels J.D., Chatterjee S., Stanley C.B., Qian S., Cheng X., Myles D.A.A., Standaert R.F., Elkins J.G., Katsaras J. The in vivo structure of biological membranes and evidence for lipid domains // *PLOS Biol.* 2017. V. 15. e2002214. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002214>
3. Laloi M., Perret A.-M., Chatre L., Melser S., Cantrel C., Vaultier M.-N., Zachowski A., Bathany K., Schmitter J.-M., Vallet M., Lessire R., Yartmann M.-A., Moreau P. Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. P. 461. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091496>
4. Hibino H., Kurachi Y. Distinct detergent-resistant membrane microdomains (lipid rafts) respectively harvest K⁺ and water transport systems in brain astroglia // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 26. P. 2539. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05876.x>
5. Mongrand S., Stanislas T., Bayer E.M.F., Lherminier J., Simon-Plas F. Membrane rafts in plant cells // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. P. 656. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.003>
6. Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // *Sci.* 2010. V. 347. P. 46. <https://doi.org/10.1126/science.117462>
7. Cacas J.-L., Furt F., Le Guédard M., Schmitter J.-M., Buré C., Gerbeau-Pissot P., Moreau P., Bessoule J.-J., Simon-Plas F., Mongrand S. Lipids of plant membrane rafts // *Prog. in Lipid Res.* 2012. V. 51. P. 272. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.04.001>
8. Bessueille L., Sindt N., Guichardant M., Djerbi S., Teeri T.T., Bulone V. Plasma membrane microdomains from hy-

- brid aspen cells are involved in cell wall polysaccharide biosynthesis // *Biochem. J.* 2009. V. 420. P. 93. <https://doi.org/10.1042/bj2008211>
9. Sun J., Nanjundan M., Pike L.J., Wiedmer T., Sims P.J. Plasma membrane phospholipid scramblase 1 is enriched in lipid rafts and interacts with the epidermal growth factor receptor // *Biochem.* 2002. V. 41. P. 6338. <https://doi.org/10.1021/bi0256101>
 10. Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Lee O.R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S.N., Cheng Y., Bouchard R., Adamec J., Geisler M., Nagashima A., Sakai T., Martinoia E., Friml J., et al. Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis* // *Plant Cell Online.* 2007. V. 19. P. 131. <https://doi.org/doi:10.1105/tpc.106.040782>
 11. Demira F., Horntricha C., Blachutzjka J.O., Scherzera S., Reindersc Y., Kierszniowska S., Schulze W.X., Harmsb G.S., Hedricha R., Geigera D., Kreuzera I. *Arabidopsis* nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3 // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2013. V. 110. P. 8296. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1211667110>
 12. Yang H., Richter G.L., Wang X., Młodzińska E., Carraro N., Ma G., Jenness M., Chao D., Peer W.A., Murphy A.S. Sterols and sphingolipids differentially function in trafficking of the *Arabidopsis* ABCB19 auxin transporter // *Plant J.* 2012. V. 74. P. 37. <https://doi.org/10.1111/tpj.12103>
 13. Ott T. Membrane nanodomains and microdomains in plant – microbe interactions // *Cur. Opin. Plant Biol.* 2017. V. 40. P. 82. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.008>
 14. Flowers T.J., Glenn E.P., Volkov V. Could vesicular transport of Na⁺ and Cl⁻ be a feature of salt tolerance in halophytes? // *Ann. Bot.* 2019. V. 123. P. 1. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy164>
 15. Ozolina N.V., Kapustina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N. Role of tonoplast microdomains in plant cell protection against osmotic stress // *Planta.* 2022. V. 255. P. 65. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03800-3>
 16. Bhat R.A., Miklis M., Schmelzer E., Schulze-Lefert P., Panstruga R. Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2005. V. 102. P. 3135. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500012102>
 17. Nesterov V.N., Nesterkina I.S., Rozentsvet O.A., Ozolina N.V., Salyaev R.K. Detection of lipid-protein microdomains (rafts) and investigation of their functional role in the chloroplast membranes of halophytes // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017. V. 476. P. 303. <https://doi.org/10.1134/S1607672917050040>
 18. Takahashi D., Imai H., Kawamura Y., Uemura M. Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance // *Cryobiol.* 2016. V. 72. P. 123. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.003>
 19. Valitova J.N., Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological function // *Biochem. (Moscow).* 2016. V. 81. P. 819. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
 20. Dreyer I., Uozumi N. Potassium channels in plant cells // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 4293. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08371.x>
 21. Rahman Md. M., Mostofa M.G., Keya S.S., Siddiqui Md.N., Ansary Md.M.U., Das A.K., Rahman Md.A., Tran L.S.-P. Adaptive mechanisms of halophytes and their potential in improving salinity tolerance in plants // *IJMS.* 2021. V. 22. P. 10733. <https://doi.org/10.3390/ijms221910733>
 22. Shabala S., Mackay A. Ion transport in halophytes // *Advan. Bot. Res.* 2011. V. 57. P. 151. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387692-8.00005-9>
 23. Trono D., Laus M.N., Soccio M., Pastore D. Transport pathways – proton motive force interrelationship in durum wheat mitochondria // *IJMS.* 2014. V. 15. P. 8186. <https://doi.org/10.3390/ijms15058186>
 24. He C., Berkowitz O., Hu S., Zhao Y., Qian K., Shou H., Whelan J., Wang Y. Co-regulation of mitochondrial and chloroplast function: Molecular components and mechanisms // *Plant Commun.* 2023. V. 4. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100496>
 25. Wang Z., Benning C. Chloroplast lipid synthesis and lipid trafficking through ER-plastid membrane contact sites // *Biochem. Society Trans.* 2012. V. 40. P. 457. <https://doi.org/10.1042/BST20110752>
 26. Horvath S.E., Daum G. Lipids of mitochondria // *Prog. Lipid Res.* 2013. V. 52. P. 590. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
 27. Rozentsvet O., Nesterkina I., Ozolina N., Nesterov V. Detergent-resistant microdomains (lipid rafts) in endomembranes of wild halophytes // *Func. Plant Biol.* 2019. V. 46. P. 869. <https://doi.org/10.1071/FP18263>
 28. Robinson S.P., Downton W.J.S. Potassium, sodium, and chloride content of isolated intact chloroplasts in relation to ionic compartmentation in leaves // *Arch. Biochem. Biophys.* 1984. V. 228. P. 197. [https://doi.org/doi:10.1016/0003-9861\(84\)90061-4](https://doi.org/doi:10.1016/0003-9861(84)90061-4)
 29. Rozentsvet O.A., Nesterov V.N., Sinyutina N.F. The effect of copper ions on the lipid composition of subcellular membranes in *Hydrilla verticillata* // *Chemosphere.* 2012. V. 89. P. 108. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.034>
 30. Mellgren R.L. Detergent-resistant membrane subfractions containing proteins of plasma membrane, mitochondrial, and internal membrane origins // *J. Biochem. Biophys. Meth.* 2008. V. 70. P. 1029. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2007.08.001>
 31. Нестеров В.Н., Розенцвет О.А., Богданова Е.С. Влияние абиотических факторов на состав жирных кислот *Ulva intestinalis* // *Сибирский экологический журнал.* 2013. № 4. С. 587.
 32. Розенцвет О.А., Нестеров В.Н., Богданова Е.С. Структурные и физиолого-биохимические аспекты солеустойчивости галофитов // *Физиология растений.* 2017. Т. 64. С. 251. <https://doi.org/10.7868/S001533031704011X>
 33. Lv S., Jiang P., Chen X., Fan P., Wang X., Li Y. Multiple compartmentalization of sodium conferred salt tolerance in *Salicornia europaea* // *Plant Physiol. Biochem.*

2012. V. 51. P. 47.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.10.015>
34. *Rozentsvet O., Nesterov V., Bogdanova E., Kosobryukhov A., Subova S., Semenova G.* Structural and molecular strategy of photosynthetic apparatus organization of wild flora halophytes // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 129. P. 213.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.006>
35. *Chen M., Cahoon E.B.* Plant sphingolipids: structure, synthesis and function // *Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions* / Eds. Wada H., Murata N., Dordrecht: Springer. 2009. P. 77.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-28631_5
36. *Sperling P., Heinz E.* Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1632. P. 1.
[https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(03\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(03)00033-7)
37. *Jiang Z., Zhou X., Tao M., Yuan F., Liu L., Wu F., Wu X., Xiang Y., Niu Y., Liu F., Li C., Ye R., Byeon B., Xue Y., Zhao H., et al.* Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca^{2+} influx // *Nature.* 2019. V. 572. P. 341.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1449-z>
38. *Abbas H.K., Paul R.N., Boyette C.D., Duke S.O., Vesonder R.F.* Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves // *Can. J. Bot.* 1992. V. 70. P. 1824.
<https://doi.org/10.1139/b92-226>
39. *Lindsey K., Pullen M.L., Topping J.F.* Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signaling // *Tren. Plant Sci.* 2003. V. 8. P. 521.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.09.012>
40. *Nieto B., Fores O., Arro M., Ferrer A.* Arabidopsis 33hydroxy33methylglutaryl CoA reductase is regulated at the posttranslational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways // *Phytochem.* 2009. V. 70. P. 53.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.10.010>
<https://doi.org/10.1016/j>

СВЯЗЬ ДЕГИДРИНОВ С АДАПТАЦИЕЙ ЛИСТВЕННИЦЫ КАЯНДЕРА К УСЛОВИЯМ КРИОЛИТОЗОНЫ ЯКУТИИ

© 2023 г. Т. Д. Татарина^а*, А. А. Перк^а, А. Г. Пономарев^а, И. В. Васильева^а

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

*e-mail: t.tatarinova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.02.2023 г.

После доработки 13.03.2023 г.

Принята к публикации 17.03.2023 г.

Исследованы особенности состава и сезонных изменений стрессовых белков-дегидринов лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr), произрастающей в условиях экстремально холодного климата криолитозоны Центральной Якутии и отличающейся необычайно высокой морозоустойчивостью. С использованием технологии иммуноблоттинга впервые в побегах *L. cajanderi* выявлены мажорные дегидрины в интервале мол. м. 17–20, 37–42 и 73 кД. Установлен высокий уровень полиморфизма дегидринов внутри популяции *L. cajanderi*, различия между изученными экземплярами деревьев обнаружены, в основном, в области мол. м. 20–37 кД. В годичном цикле лиственницы наибольшим сезонным изменениям подвержены низкомолекулярные дегидрины, их содержание возрастало в конце фенологической осени и достигало постоянного уровня в период максимально низких зимних температур. Особенности сезонных изменений и значительное разнообразие состава дегидринов в побегах лиственницы могут указывать на их вероятное участие в формировании уникальной морозоустойчивости *L. cajanderi* при адаптации данного вида хвойных растений к условиям криолитозоны.

Ключевые слова: *Larix cajanderi*, адаптация, дегидрины, криолитозона, низкие температуры, стрессовые белки

DOI: 10.31857/S001533032360016X, **EDN:** WWJMZE

ВВЕДЕНИЕ

Древесные растения, произрастающие в условиях экстремально холодного климата и многолетней мерзлоты Центральной Якутии, отличаются необычайно высокой морозоустойчивостью благодаря их способности адаптироваться к холодному фактору. Сверхнизкие зимние температуры воздуха (до -60°C и ниже) без возвратных потеплений, а также их резкие суточные перепады в межсезонье определяют жизнеспособность и видовой состав дендрофлоры в криолитозоне. В этой связи, в бореальных лесах Северо-Востока Сибири главную роль играют хвойные деревья сем. Сосновые (*Pinaceae* Lindl.) – лиственница Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) и лиственница даурская или Гмелина (*L. dahurica* Turcz. et Trautv. = syn. *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr), далеко превосходящие по ареалу и количеству растений другие виды [1, 2].

Стрессовые факторы различной природы (низкие температуры, засуха, засоление и др.) могут индуцировать в растениях экспрессию генов специфических белков, в т.ч. с криопротекторными свойствами. В формировании устойчивости древесных растений к экстремальным климатическим условиям криолитозоны Якутии, вероятно, при-

мают участие и стрессовые белки-дегидрины, физиологическую роль которых связывают с защитой биополимеров и мембран клеток растений от повреждений, вызванных низкими температурами и дегидратацией [3–7].

Дегидрины представляют собой высокогидрофильные белки семейства LEA (Late Embryogenesis Abundant) или белки позднего эмбриогенеза и обнаружены у большинства таксономических групп растений [3, 5, 8, 9]. Для дегидринов характерны термостабильность, высокая степень конформационной лабильности и наличие в них специфических последовательностей, обогащенных полярными аминокислотами, особенно лизином и пролином. Наиболее распространенный пептидный мотив из 15 аминокислот (EKKGIMDKI-KEKLPQ) или консервативный K-сегмент, является общим для всех изученных дегидринов [3, 8, 10]. Различные сочетания консервативного K-сегмента и переменных (Y-, S-) сегментов определяют их функциональные свойства, связанные с криопротекторной, антифризной, антиоксидантной и металлсвязывающей функциями [4–6, 11, 12].

Стрессовые белки-дегидрины голосеменных растений изучены в гораздо меньшей степени,

чем у покрытосеменных. При этом выявлены некоторые особенности в организации генома хвойных видов [13, 14]. Так, им свойственны значительно более крупные семейства генов дегидринов [15, 16]. Например, в базе данных транскриптома *Picea glauca* идентифицировано 53 разных генов дегидринов [17]. Кроме того, в составе дегидринов *Pinaceae* вместо Y-сегментов обнаружены A- и E-сегменты и специфичные N-концевые области [13, 14]. Разнообразие множества дегидринов с разным составом последовательностей A-, E-, S-, N- и K-сегментов предполагает не только сложность экспрессии их генов, но и возможность участия данных белков в развитии устойчивости хвойных древесных к различным стрессовым воздействиям, включая и низкие отрицательные температуры.

Резкое усиление экспрессии генов дегидринов и накопление их белковых продуктов отмечали при обезвоживании в тканях вегетирующих растений. Например, экспрессия семейства генов дегидринов выявлена у двух видов сосны – приморской (*Pinus pinaster*) и кедровой (*P. pinea*), подвергнутых водному стрессу [13, 18]. Наряду с этим, сообщалось, что дегидрины могут предотвращать коагуляцию макромолекул при различных температурах и низких осмотических условиях [8]. Короткий фотопериод и низкие закалывающие температуры, приводящие к дегидратации клеток, вызывали в разных органах и тканях растений умеренной зоны накопление дегидринов [4, 5, 9, 19], в том числе у хвойных деревьев [20–22]. К настоящему времени дегидрины обнаружены в хвое сосны обыкновенной *Pinus sylvestris*, произрастающей в разных природно-климатических условиях: в криолитозоне Центральной Якутии [23, 24] и в регионе Предбайкалья [21, 22], а также в хвое ели сибирской *Picea obovata* на северо-востоке Фенноскандии [16] и на юге Сибири [22]. Связь между сезонным накоплением некоторых дегидринов и развитием морозостойчивости хвойных деревьев выявлена, например, у ели сибирской *Picea obovata* [16] и сосны веймутовой *Pinus strobus* [25].

Устойчивость к холоду у древесных растений изначально развивается в ответ на сокращение фотопериода и снижение температуры окружающей среды, индуцирующими экспрессию специфических генов, чувствительных к низким температурам, и синтез стрессовых белков. Вероятно, стрессовые белки-дегидрины, накапливающиеся в период осеннего перехода к зимнему покою, принимают участие в осмо- и криозащитных механизмах при низкотемпературной адаптации древесных растений к условиям холодного климата [5, 7, 11].

Огромные территории лиственничных лесов, охватывающие различные географические и климатические условия, свидетельствуют об боль-

шой экологической пластичности лиственницы как вида. Среди древесных пород мира якутская популяция лиственницы не имеет конкурентов по своей морозоустойчивости, выдерживая в зимнее время температуру ниже -60°C [26, 27]. Более того, меристематические ткани почек лиственницы могут сохранять жизнеспособность при замораживании до критически низкой температуры -196°C [28]. Обладая специфическими особенностями в транспирации, лиственницы также легко переносят летнее обезвоживание при высокой температуре воздуха [29]. Такие свойства указывают на существование у данного вида сформированного и наследственно закрепленного механизма, позволяющего сохранить жизнеспособность клеток в условиях холодных регионов в самых северных в мире ареалах произрастания древесных растений. Вследствие этого, доминирующими из хвойных деревьев на территории Республики Саха (Якутия) являются лиственницы даурская (Гмелина) и Каяндера, занимающие более 79% лесопокрытой площади региона [26, 27].

Исследования роли стрессовых белков, включая дегидрины, в формировании криоустойчивости лесообразующих древесных растений на Северо-Востоке Евразии немногочисленны. Ранее нами впервые были идентифицированы дегидрины в тканях березы повислой и сосны обыкновенной, произрастающих в условиях Центральной Якутии [30–32]. Дегидрины хвойных деревьев, в основном, изучены у некоторых вечнозеленых видов, тогда как дегидрины летнезеленой лиственницы почти не исследованы. Вместе с тем, надземные органы древесных растений в условиях криолитозоны наиболее подвержены длительному воздействию низких температур, приводящих к осмотическому стрессу. В этой связи, изучение механизмов, ответственных за формирование уникальной способности лиственницы переносить экстремально низкие зимние температуры, характерные для криолитозоны, представляется весьма актуальным. Выяснение роли стрессовых белков-дегидринов в развитии необычайно высокой морозоустойчивости хвойных пород на примере *L. cajanderi* позволит выявить особенности их адаптации к специфическим условиям произрастания, а также обнаружить общие закономерности формирования низкотемпературной устойчивости древесных растений криолитозоны.

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей состава стрессовых белков-дегидринов и их изменений в сезонном цикле хвойных растений на примере лиственницы Каяндера (*L. cajanderi* Maug) в условиях холодного климата и многолетней мерзлоты Центральной Якутии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования в работе явилась лиственница Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) – бореальный восточноазиатский вид, главная лесобразующая порода Якутии и Северо-Востока Сибири. Произрастает в чрезвычайно суровых климатических условиях как на равнине, так и в горах. Следует отметить, что некоторые авторы рассматривают лиственницу Каяндера как восточную расу или подвид лиственницы даурской (Гмелина) [1, 2]. Эти же виды являются и самыми долгоживущими деревьями, отдельные экземпляры которых достигают возраста 900 лет.

Климат Центральной Якутии характеризуется экстремальными условиями: среднемесячная температура воздуха в январе составляет -38.6°C , годовое количество осадков – 237 мм. Температурные значения в регионе отслеживали по сайту URL <http://meteo.ru/data>. Климатические показатели в период сбора образцов в целом не отличались от среднегодовых. Материалом исследования служили однолетние побеги лиственницы Каяндера без хвои, произрастающей в природных условиях (лесопарковая зона Ботанического сада ИБПК СО РАН, окрестности г. Якутска, 62° с.ш., 129° в.д.). Сбор и исследование биологического материала проводили в течение 2011–2016 гг. Методика сбора образцов и их обработка, в зависимости от условий эксперимента, варьировала. При отборе проб на биохимический анализ, материал сразу после получения фиксировали и хранили в жидком азоте до процедуры выделения белков. Для выявления полиморфизма дегидринов в период зимнего покоя (10.02.2011 г., минимальная температура воздуха – 43.8°C , средняя – -37.3°C) пробы отбирали индивидуально для каждого растения. Экземпляры деревьев ($n = 13$) обозначены региональным индексом и номером – YaL1–YaL13. При изучении сезонной динамики состава дегидринов сбор материала по отдельным растениям (YaL1, YaL6, YaL10, YaL11) осуществляли круглогодично (2011–2012 гг.) не реже одного раза в месяц.

Выделение суммарных белков из однолетних побегов лиственницы проводили согласно [21]. Навеску ткани (1.5–2.0 г) измельчали в ступке в жидком азоте в присутствии нерастворимого поливинилпирролидона (“Serva”, Германия, 2.5% по отношению к объему буфера). Все процедуры проводили при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Белки экстрагировали буфером, содержащим 0.1 М Трис-НСI, pH 7.5, 12 мМ β -меркаптоэтанол, 1% ДДС-Na, 10 мМ ЭДТА, 3 мМ ФМСФ (фенилметилсульфанилфторид). Гомогенат центрифугировали при 50000 g в течение 40 мин. К супернатанту, профильтрованному через капроновую ткань, добавляли поливинилпирролидон (2.5%) и центрифугировали при 50000 g в течение 35 мин. Суммарные белки осаждали пятью объемами ацетона при

температуре -20°C в течение 1 ч. Осадок белка гомогенизировали в электрофоретическом буфере, содержащем 1 М Трис-НСI, pH 7.5, 10% ДДС-Na, 5% β -меркаптоэтанол, 10% глицерол. Раствор белка просветляли центрифугированием при 17000 g (20 мин, $+4^{\circ}\text{C}$) и использовали для проведения электрофореза. Содержание белка определяли по методу Bradford [34]. Электрофоретическое разделение белков проводили в 13.5% ПААГ в присутствии ДДС-Na [35] с использованием маркеров молекулярной массы (“ThermoScientific”, США) и последующим окрашиванием Кумасси G-250 (“Serva”, Германия). На треки наносили равное количество белка (10–15 мкг). Выравнивание белков в треках ПААГ проводили опытным путем по интенсивности окраски белковых полос в сравнении с известным количеством контрольного образца (10–15 мкг). Перенос белков из ПААГ на ПВДФ (поливинилидендифторид) мембрану (“Bio-Rad”, США) проводили по методу Timmons и Dunbar [36]. Идентификацию дегидринов выполняли с помощью поликлональных антител против их К-сегмента (ЕККGIME/ДКIKEKLPG) в разведении 1 : 500 (“Agrisera”, Швеция). Дегидрины визуализировали при помощи антикриличьих антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой в разведении 1:2500 (“Sigma”, США). В качестве хромогенных субстратов использовали 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат и нитротетразолий синий (“AppliChem”, Германия). Данные сканирования гелей и мембран обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.41o/Java 1.50_09 (США). Количественные показатели содержания дегидринов оценивали по интенсивности окраски мембраны в относительных единицах денситометрической плотности (отн. ед., D). Значение денситометрической плотности дегидрина с мол. м. 14 кД в июле принято за нулевой уровень. На рисунках представлены типичные мембраны, отражающие стабильно воспроизводимые результаты иммунодетекции дегидринов лиственницы с использованием специфических антител против К-сегмента.

Для интегральной количественной оценки морозоустойчивости растений использовали показатель проницаемости клеточных мембран, оцениваемый по выходу электролитов (electrolyte leakage method) [33]. Навеску свежесобранных побегов (1 г) сразу после сбора нарезали и инкубировали в 40 мл дистиллированной воды в термостате при постоянной температуре 25°C в течение 24 ч. Затем образцы подвергали кипячению для полного выхода электролитов. Условия опытов были подобраны в ходе предварительных экспериментов с варьированием соотношений массы навески к объему воды и длительности последующей экстракции. Выход электролитов до и после фиксации проб кипячением определяли по электропроводности (G) вытяжек с помощью реохордного моста P38 на переменном токе часто-

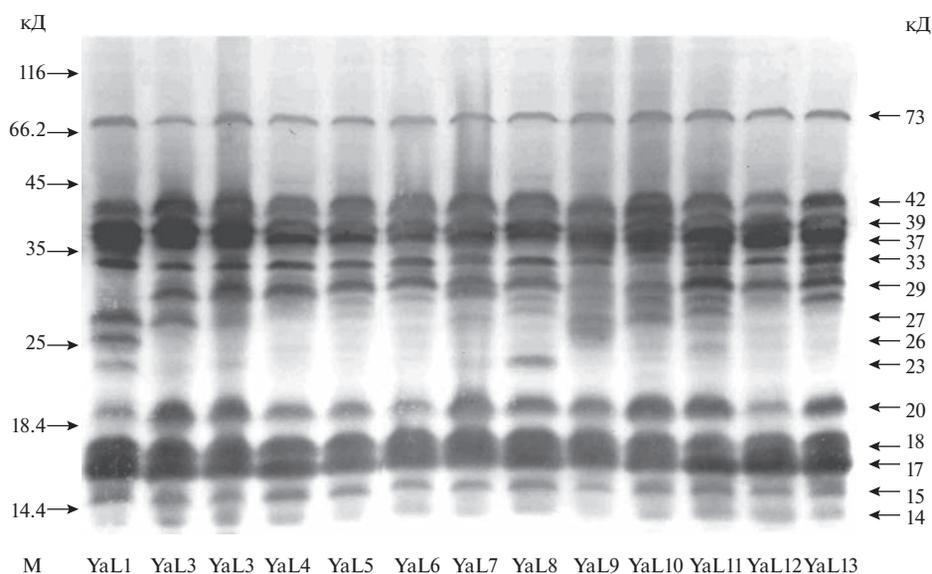


Рис. 1. Результаты иммуноблоттинга дегидринов в побегах отдельных экземпляров (YaL1–YaL13) лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) в Центральной Якутии в период зимнего покоя. Все образцы ($n = 13$) собраны 10.02.2011 г. (минимальная температура воздуха составила -43.8°C) и фиксированы для хранения в жидком азоте. Представлены типичные мембраны иммунодетекции дегидринов. Указаны молекулярные массы: слева – маркеров (М), справа – дегидринов.

той 50 Гц с использованием кондуктометрического датчика УК-02/1. Величина G водных вытяжек прямо пропорциональна повреждающему клеточные мембраны фактору. Степень морозоустойчивости растений в их годовом цикле оценивали в виде коэффициента морозоустойчивости (K_M), выражаемого отношением G_H нативной вытяжки к G_F фиксированных кипячением образцов.

Измерения выполнены в трехкратной биологической повторности с привлечением статистического пакета Microsoft Office Excel 2010, в результатах приведены средние арифметические величины и их стандартные отклонения, различия значимы при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Произрастающие в суровых природно-климатических условиях Центральной Якутии древесные растения приобрели необычайно высокую морозоустойчивость. В защите клеток растений в ответ на стресс-факторы различной природы, в т.ч. к холодовому, связанному с дегидратацией, основная роль отводится стрессовым белкам-дегидринам. В данной работе впервые с использованием специфических антител в однолетних побегах лиственницы Каяндера обнаружены дегидрины в области мол. м. 14–42 и 73 кД. При сравнении отдельных экземпляров в период зимнего покоя деревьев (февраль) выявлен высокий уровень полиморфизма данных белков в центрально-якутской популяции *L. cajanderi*. Существен-

ным отличием дегидринов в побегах лиственницы явилось их необычайно высокое разнообразие, поскольку большая часть этих белков обнаруживалась в диапазоне мол. м. 14–42 кД (рис. 1).

Во всех изученных образцах лиственницы в низкомолекулярной области в сравнительно большем количестве обнаружены дегидрины с мол. м. 17, 18 и 20 кД, в меньшем – 14 и 15 кД, а также в среднеммолекулярной области представлены мажорные дегидрины с мол. м. 37, 39, 42 кД. Из других дегидринов, белки с мол. м. 29 кД наблюдали в побегах большинства деревьев лиственницы, тогда как белки 23, 26 и 27 кД встречались лишь у отдельных экземпляров. Среди высокомолекулярных полипептидов в зимний период в побегах всех изученных деревьев идентифицировали дегидрин с мол. м. 73 кД. Наличие или отсутствие в спектре белков тех или иных дегидринов, а также их количественное содержание определяли индивидуальные различия между отдельными лиственницами. Таким образом, дегидрины в побегах лиственницы в зимний период во время покоя проявляли более высокую вариабельность в среднеммолекулярной области 23–29 кД, чем в низко- и высокомолекулярных областях.

Для выявления вероятной связи дегидринов с формированием морозоустойчивости лиственницы Каяндера в специфических условиях криолитозоны Якутии было предпринято изучение их сезонной динамики. Нами обнаружено, что в течение годичного цикла деревьев большая часть мажорных дегидринов в побегах лиственницы в осенне-зим-

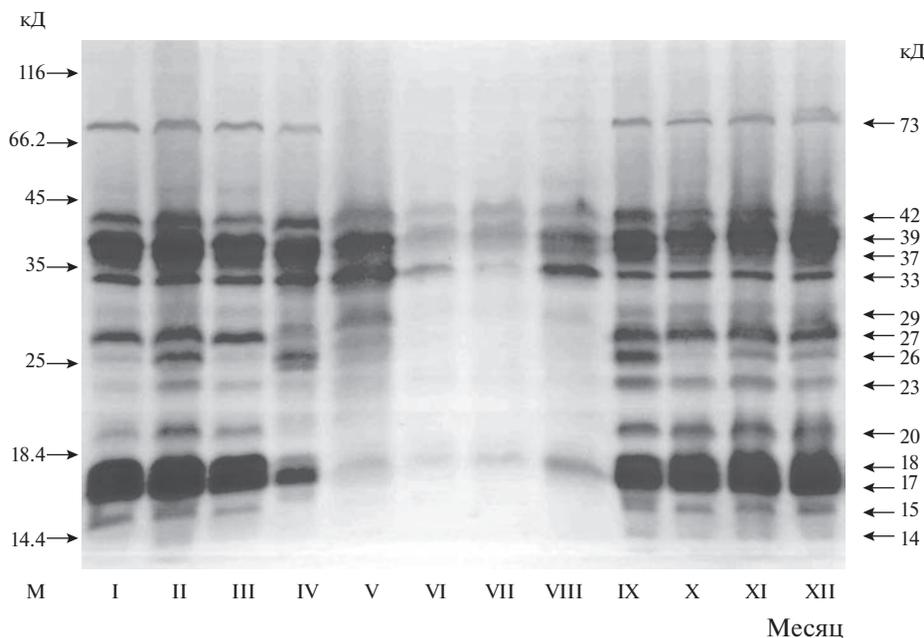


Рис. 2. Сезонные изменения дегидринов в побегах лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) (YaL1) в Центральной Якутии. Образцы были собраны в течение годового цикла (2011–2012 гг.) и фиксированы для хранения в жидком азоте. Представлены типичные мембраны иммунодетекции дегидринов. Указаны молекулярные массы: слева – маркер (М), справа – дегидринов.

ний и зимне-весенний периоды представлена равномерно, но подвергается существенным изменениям в летние месяцы (рис. 2).

Дегидрины с мол. м. 33, 37, 39, 42 кД оказались менее подвержены сезонным изменениям – они не исчезали полностью в летние месяцы, хотя их количество уменьшалось. Более сглаженная динамика в годичном цикле лиственницы проявлялась в высокомолекулярной области у дегидрина 73 кД, который почти пропадал в летние месяцы и появлялся вновь в сентябре. Такие особенности этой группы дегидринов могут указывать на их более вероятные конститутивные свойства, связанные с участием в метаболических процессах в клетках хвойных. Наиболее отчетливо ход сезонных изменений дегидринов лиственницы прослеживается в изменениях низкомолекулярных белков, особенно в области мол. м. 14–29 кД, во время вегетации (в июне – июле). Почти все дегидрины появлялись к сентябрю в период осеннего перехода древесных растений к зимнему покою. При этом, уровень дегидринов 17 и 18 кД в побегах лиственницы был значительно выше, чем таковой других низкомолекулярных 14, 15 и 20, 23, 26, 27, 29 кД, содержание которых заметно возрастало осенью с августа до октября (до 22 раз). Затем дегидрины достигали и сохраняли стабильно высокий уровень в самые холодные месяцы зимы (ноябрь – март), когда отмечались наиболее низкие отрицательные температуры. Можно предположить, что в этот низкотемпературный период морозоустой-

чивость древесных растений в условиях криолитозоны достигала максимальных значений.

Весной (апрель – май), на фоне подъема температуры воздуха и начала оттаивания мерзлотных почв в побегах лиственницы в начале вегетации деревьев происходило заметное падение уровня дегидринов. В летние месяцы содержание большинства данных белков значительно снижалось, а некоторые, особенно в низкомолекулярной области с мол. м. 14, 15, 21, 23, 26, 27, 29 кД почти исчезали. Количество низкомолекулярных дегидринов 17, 18 кД, уменьшалось в гораздо большей степени от 460–520 до 40–50 отн. ед., чем среднемолекулярных, например, белков с мол. м. 37 и 39 кД от 370–410 до 130–160 отн. ед., соответственно, но те и другие не исчезали полностью. Обнаруженные изменения в составе индивидуальных дегидринов в годичном цикле центрально-якутской популяции лиственницы четко прослеживаются на гистограммах (рис. 3).

Из приведенных данных следует, что максимальное накопление дегидринов происходило к концу фенологической осени и устойчиво сохранялось в холодный период года. Самый высокий уровень дегидринов в побегах лиственницы наблюдали во время зимнего покоя деревьев в период экстремально низких температур, что указывает на тесную связь данных белков с низкотемпературной адаптацией лиственницы к условиям криолитозоны.

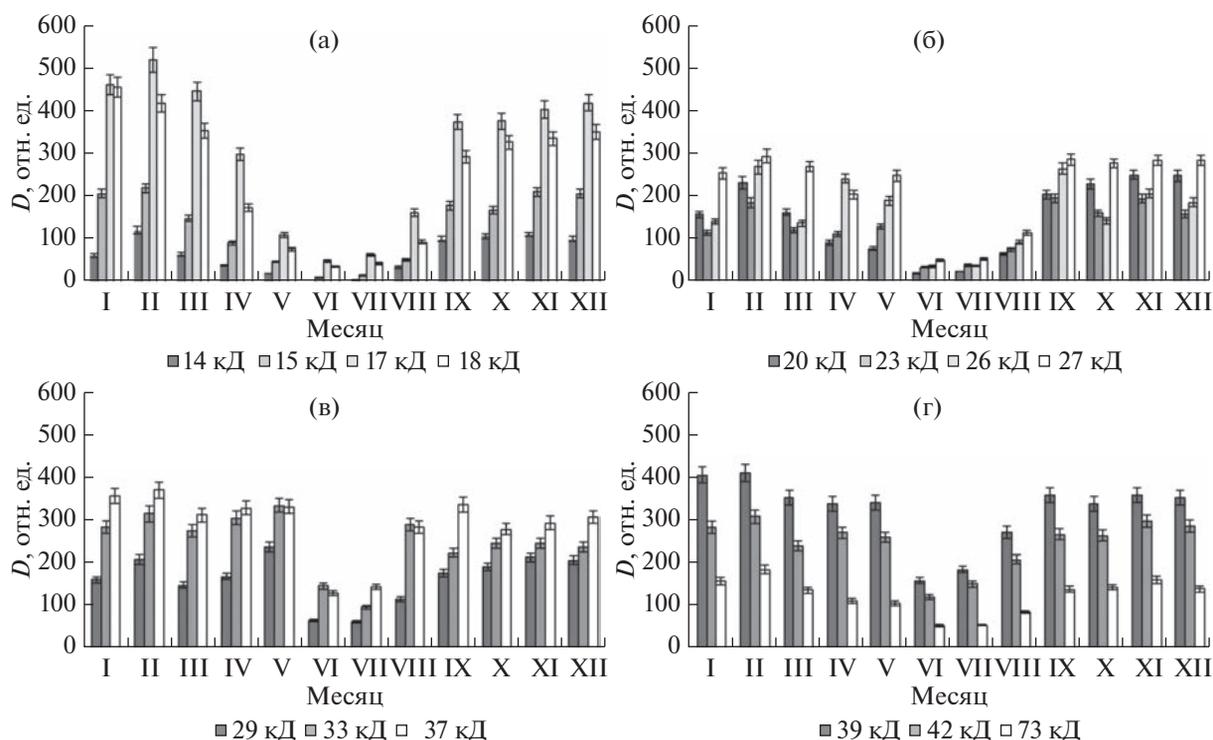


Рис. 3. Динамика сезонных изменений состава отдельных дегидринов (а–г) в побегах лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) (YaL1) в Центральной Якутии. Образцы были собраны в течение годового цикла (2011–2012 гг.) и фиксированы для хранения в жидком азоте. На гистограммах значение денситометрической плотности (D , отн. ед.) дегидрина 14 кД в июле принято за нулевой уровень. Представлены данные в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений, различия значимы при $P < 0.05$.

С целью оценки степени морозоустойчивости лиственницы Каяндера и выявления ее связи с уровнем дегидринов было предпринято изучение проницаемости клеточных структур побегов с использованием метода электролитов. Ежемесячная динамика изменения суммарных дегидринов Σ_D и относительной морозоустойчивости K_M деревьев на фоне среднемесячных температур воздуха $t^{\circ}C$ в Центральной Якутии приведена на рис. 4.

Данный метод ранее хорошо зарекомендовал себя при изучении некоторых видов плодовых культур в условиях Якутии [33]. Как и ожидалось, наибольшие значения коэффициента морозоустойчивости в побегах лиственницы наблюдали в зимние месяцы, когда он достигал показателей 0.53–0.65. Тенденцию спада K_M у деревьев фиксировали в начале весны (апрель), когда он уменьшался до 0.43–0.45 и далее снижался до минимальных значений в летние месяцы – 0.34. Ближе к осенне-зимнему периоду при подготовке растений к покою (август), показатели K_M снова возрастали. При этом, в побегах лиственницы Каяндера наблюдали синхронные однонаправленные изменения коэффициента морозоустойчивости K_M и содержания суммарных дегидринов D (отн. ед.) (рис. 4). Обратная зависимость имеет место для

связи температуры воздуха с K_M и уровнем дегидринов, особенно их низкомолекулярных форм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды формируется в результате комплекса структурных и физиолого-биохимических изменений клеток и тканей, однако механизмы их низкотемпературной адаптации в природных условиях до сих пор изучены недостаточно.

Особую роль в адаптации растений к абиотическим стрессорам играют защитные белки-дегидрины, препятствующие потере клеткой воды за счет высокой гидрофильности и стабилизирующие клеточные белки. В данном исследовании показано, что в годичных побегах *L. cajanderi* в условиях криолитозоны обнаружены стрессовые белки-дегидрины, преимущественно в области мол. м. 14–42 и 73 кД. Мажорные дегидрины лиственницы представлены белками с мол. м. 17, 18, 20, 37, 39 и 42 кД. Несколько меньше по содержанию составляли 14, 15, 17, 18, 20 кД, а также 73 кД дегидрины. Кроме того, в области мол. м. 20–37 кД отмечали большое разнообразие минорных изоформ дегидринов (от 3 до 5), которые определяли индивидуальные качественные и ко-

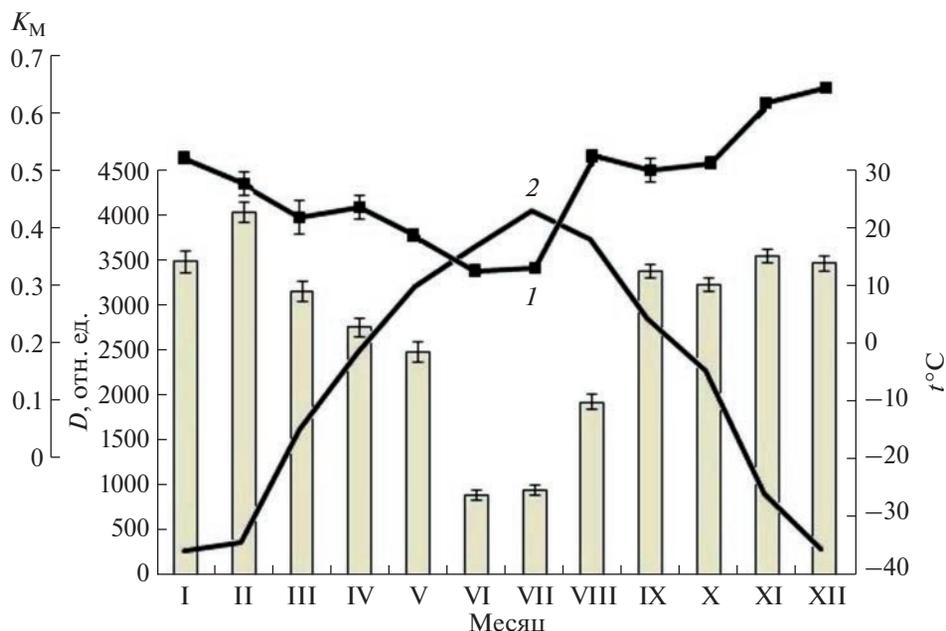


Рис. 4. Динамика изменения суммарных дегидринов Σ_D и морозоустойчивости K_M (1) в побегах лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) (YaL1) на фоне среднемесячных температур воздуха $t^\circ\text{C}$ (2) в Центральной Якутии (2011 г.). Степень морозоустойчивости растений в их годовом цикле оценивали в виде коэффициента морозоустойчивости (K_M). Приведены результаты экспериментов трех биологических повторностей с привлечением статистического пакета Microsoft Office Excel 2010. Представлены данные в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений, различия значимы при $P < 0.05$.

личественные различия между отдельными экземплярами лиственницы, особенно в зимний период. Высокий уровень полиморфизма дегидринов в побегах отдельных экземпляров центрально-якутской популяции лиственницы может свидетельствовать о значительном потенциале холодоустойчивости изучаемого вида, направленного для защиты и обеспечения жизнедеятельности растений и, вероятно, обусловлен особенностями низкотемпературной адаптации древесных растений рода *Larix* к условиям климата криолитозоны. Известно, что лиственница имеет наиболее высокий уровень летней транспирации среди хвойных деревьев, превосходя вечнозеленые виды по данному показателю в 2–3 раза [29]. В связи с этим она вынуждена сбрасывать хвою с наступлением морозов, обеспечивая свою криотолерантность, в том числе, за счет снижения потери воды в результате зимней транспирации. Сведения о внутривидовом полиморфизме дегидринов, а также их предполагаемой связи с адаптацией у других видов древесных, в том числе хвойных растений, практически отсутствуют. Так, была выявлена аллельная изменчивость данного типа белков в пяти природных популяциях *Quercus petraea* [37].

Анализ сезонных изменений дегидринов показал, что стрессовым белкам-дегидринам в годичном цикле лиственницы Каяндера свойственны характерные изменения, приводящие к их накоплению в

период осеннего перехода растений к покою, стабильно высокому уровню в зимние месяцы (ноябрь – март) и затем снижению их содержания в весенний период года (апрель – май). По данным литературы, изучение сезонной вариабельности экспрессии генов дегидринов и содержания этих белков у различных видов выявило их высокий уровень зимой и низкий – летом во время их интенсивного роста. Большинство дегидринов древесных растений индуцируется в ответ на низкую температуру, а некоторые из них – на низкую температуру и на короткий день [11]. У древесных растений умеренных зон отмечалось накопление дегидринов при уменьшении содержания воды во время осеннего перехода к зиме, например, в тканях *Picea obovata* [16], *Pinus sylvestris* [20, 21], *Cornus sericea* [38], *Betula pubescens* [39]. Как следует из наших данных, в сезонном цикле *L. cajanderi* для спектра белков характерно высокое разнообразие состава дегидринов, максимальное содержание которых выявлено в период зимнего покоя деревьев (февраль), когда наблюдались сверхнизкие отрицательные температуры. По-видимому, индуцируемые холодом фактором и накапливающиеся в самые морозные месяцы зимы в побегах лиственницы стрессовые белки-дегидрины, могут быть ассоциированы с формированием низкотемпературной устойчивости этого вида хвойных растений. С наступлением осени заметное сокращение длины дня и снижение температуры

окружающего воздуха вызывают остановку роста и развития растений, тем самым одновременно включая процессы дегидратации, с которыми коррелирует возрастание уже в августе некоторых дегидринов (например, с мол. м. 33, 37 и 39 кД), а затем и четкое появление в сентябре их низкомолекулярных форм (с мол. м. 17, 18, 26 и 27 кД), вероятно, необходимых для компенсации потери воды. Такое же возрастание уровня экспрессии низкомолекулярных дегидринов в условиях дефицита влаги наблюдали в хвое ели сизой *Picea glauca* [14]. Появление дегидринов, особенно низкомолекулярных, в период осенней акклимации растений к холоду указывает на их индуцибельный характер, вызванный процессами сокращения долготы дня и нарастания холодного фактора. Накопление в побегах при осеннем переходе к зимнему покою и поддержание высокого уровня дегидринов указывают на их возможное участие в защите клеток деревьев, что наряду с опадением хвои, предохраняет лиственницы от обезвоживания во время низкотемпературного периода. С установлением постоянного снежного покрова на территории Центральной Якутии (конец октября – начало ноября) содержание всех дегидринов в побегах достигает стабильно высокого уровня и остается таковым в течение всего зимнего периода. Наряду с этим, сезонные изменения состава данной группы белков согласуются с показателями, полученных с помощью кондуктометрического метода по относительному выходу электролитов из побегов. Так, древесные растения в условиях сверхнизких температур характеризуются максимальными значениями морозоустойчивости на основе измерения их клеточной проницаемости побегов лиственницы методом электролитов ($K_M = 0.53–0.65$). Наблюдаемые синхронные однонаправленные изменения морозоустойчивости, выраженные изменениям коэффициентом K_M и уровнем накопления дегидринов в побегах, также могут свидетельствовать о связи криотолерантности лиственницы Каяндера с накоплением специфических белков-дегидринов. Весной (апрель – май) по мере прогревания воздуха и начала оттаивания мерзлотных почв в побегах лиственницы происходит резкое снижение содержания, а затем фактическое исчезновение летом низкомолекулярных дегидринов с мол. м. 14, 15 и 23, 26, 27, 29 кД, за которым следовали среднемолекулярные дегидрины с мол. м. 33, 39, 42 кД. Подобные циклы сезонных изменений уровня дегидринов, связанные с акклимацией и деакклимацией растений при изменениях светового и температурного факторов, обнаружены у разных древесных и кустарниковых видов. Ранее в почках березы *B. pubescens*, произрастающей в Финляндии, в зимний период отмечались дегидрины с мол. м. 24, 30 и 33 кД [39]. Сходная динамика в накоплении дегидринов, разных по мол. м., обнаружена и у

хвойных древесных растений [16, 21, 40]. Характерные для двух видов ели *Picea glauca* и *P. obovata* дегидрины 32, 34 и 50 кД накапливались в период холодного стресса и исчезали в оптимальных условиях произрастания [40]. Значительное возрастание уровня дегидрина 16 кД в хвое совпадало с приобретением морозоустойчивости сосны веймутовой *Pinus strobus* [25]. В условиях Предбайкалья к специфичным для зимнего покоя сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* относят дегидрины с мол. м. 17, 26 и 32 кД [21], в хвое ели сибирской *Picea obovata* в октябре месяце выявлены дегидрины 14.5, 34, 38, 55 кД [22], близкие по значениям мол. м. к таковым в хвое ели *Picea obovata* 33, 35 и 53 кД, ранее описанных в работе [16]. Накопление низкомолекулярных дегидринов у зимующих древесных растений происходило, в основном, только в периоды низких отрицательных температур, что свидетельствует об их отчетливой связи с адаптацией деревьев к холодному фактору. Белки, сходные с низкомолекулярными дегидринами, ассоциированными с перезимовкой древесных растений, произрастающих в условиях многолетней мерзлоты, обнаружены в хвое сосны *P. sylvestris* (дегидрин с мол. м. 14.5–15 кД) [23, 24], в побегах и почках березы повислой *Betula pendula* (дегидрин с мол. м. 17 кД) [31, 32]. Обнаруженные в побегах лиственницы низкомолекулярные дегидрины с мол. м. 14, 15, 17, 18 кД сходны с таковыми других хвойных, в частности, с дегидринами сосны обыкновенной и ели сибирской. Белок с мол. м. 73 кД, который присутствовал постоянно в побегах лиственницы в осенне-зимний период, по мол. м. также близок к дегидрину 72 кД в хвое сосны из Предбайкалья [22]. Вероятно, близкие по мол. м. стрессовые белки-дегидрины у разных древесных хвойных могут осуществлять сходные функции в их защите от зимнего обезвоживания в низкотемпературный период. Приведенные в работе данные согласуются с физиологической ролью дегидринов, связанной с противостоянием дегидратации, в первую очередь, при низкотемпературном стрессе. Наличие и разнообразие состава дегидринов, обнаруженных у отличающейся высокой морозоустойчивостью лиственницы Каяндера, по-видимому, является необходимым условием достижения оптимального уровня ее низкотемпературной устойчивости для успешной перезимовки в суровых климатических условиях криолитозоны Якутии.

Таким образом, с использованием специфических антител в побегах лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) в условиях многолетней мерзлоты Центральной Якутии изучены особенности стрессовых белков-дегидринов и их изменения в годичном цикле. Характер сезонных изменений, значительное разнообразие состава и связанный с морозоустойчивостью высокий уровень данных белков в побегах *L. cajanderi* указывают на важ-

ную роль дегидринов в общих механизмах формирования низкотемпературной устойчивости при адаптации древесных растений к экстремально холодному климату криолитозоны.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по проекту “Исследование биогеохимических циклов и адаптивных реакций растений бореальных и арктических экосистем северо-востока России” (код научной темы: FWRS-2021-0024; № гос. регистрации в ЕГИСУ: ААААА-21-121012190034-2).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абаимов А.П., Коропачинский И.Ю.* Лиственницы Гмелина и Каяндера. Новосибирск: Наука, 1984. 121 с.
2. *Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н.* Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: изд-во СО РАН, филиал “Гео”, 2002. 707 с.
3. *Kosova K., Prasil I.T., Vitamvas P.* Role of dehydrins in plant stress response / Handbook of Plant and Crop Stress. Tucson: CRC. 2010. P. 239.
4. *Hara M.* The multifunctionality of dehydrins // *Plant Signal. Behav.* 2010. V. 5. P. 503. <https://doi.org/10.4161/psb.11085>
5. *Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y., Takeda S., Mas-moudi K.* Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms // *Plant Signal. Behav.* 2011. V. 6. P. 1503. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17088>
6. *Malik A.A., Veltri M., Boddington K.F., Singh K.K., Gra-ether S.P.* Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00709>
7. *Chang C.Y., Bräutigam K., Huner N.P., Ensminger I.* Champions of winter survival: cold acclimation and molecular regulation of cold hardiness in evergreen conifers // *New Phytol.* 2021. V. 229. P. 675. <https://doi.org/10.1111/nph>
8. *Close T.J.* Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // *Physiol. Plant.* 1996. V. 97. P. 795. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x>
9. *Аллагулова Ч.Р., Гималов Ф.Р., Шакирова Ф.М., Вахитов В.А.* Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции // *Биохимия.* 2003. Т. 68. № 9. С. 1157. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.085183>
10. *Eriksson S.K., Kutzer M., Procek J., Gröbner G., Harryson P.* Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin Lti30, a cold-induced plant stress protein // *Plant Cell.* 2011. V. 23. P. 2391.
11. *Welling A., Palva E.T.* Molecular control of cold acclimation in trees // *Physiol. Plant.* 2006. V. 127. P. 167.
12. *Cuevas-Velazquez C.L., Rendón-Luna D.F., Covarrubias A.A.* Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins // *Front. Plant Science.* 2014. V. 5. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00583>
13. *Perdiguer P., Barbero M.C., Cervera M.T., Soto A., Col-lada C.* Novel conserved segments are associated with differential expression patterns for *Pinaceae* dehydrins // *Planta.* 2012. V. 236. P. 1863. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1737-4>
14. *Sena J.S., Giguère I., Rigault P., Bousquet J., Mackay J.* Expansion of the dehydrin gene family in the *Pinaceae* is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression // *Tree Physiol.* 2018. V. 38. P. 442. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx125>
15. *Yakovlev I.A., Asante D.K., Fossdal C.G., Partanen J., Junttila O., Johnsen O.* Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce // *Planta.* 2008. V. 228. P. 459. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0750-0>
16. *Kjellsen T.D., Yakovlev I.A., Fossdal C.G., Strimbeck G.R.* Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*) // *Tree Physiol.* 2013. V. 33. P. 1354. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt105>
17. *Rigault P., Boyle B., Lepage P., Cooke J.E.K., Bousquet J., MacKay J.J.* A white spruce gene catalog for conifer genome analyses // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 14. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179663>
18. *Velasco-Conde T., Yakovlev I., Majada J.P., Aranda I., Johnsen O.* Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response // *Tree Genet. Genom.* 2012. V. 8. P. 957. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0476-9>
19. *Welling A., Rinne P., Vihera-Aarnio A., Kontunen-Soppela S., Heino P., Palva E.T.* Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.) // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 507.
20. *Kontunen-Soppela S., Laine K.* Seasonal fluctuation of dehydrins is related to osmotic status in Scots pine needles // *Trees.* 2001. V. 15. P. 425. <https://doi.org/10.1007/s004680100124>
21. *Korotaeva N.E., Oskorbina M.V., Kopytova L.D., Suvo-rova G.G., Borovskii G.B., Voynikov V.K.* Variations in the content of stress proteins in the needles of common pine (*Pinus sylvestris* L.) within an annual cycle // *J. For. Res.* 2012. V. 17. P. 89. <https://doi.org/10.1007/s10310-011-0260-y>
22. *Коротаева Н.Е., Иванова М.В., Суворова Г.Г., Боровский Г.Б.* Дегидрины в адаптации сосны обыкновенной и ели сибирской к условиям произрастания в период вегетации // *Сибирский лесной журнал.* 2020. № 6. С. 54. <https://doi.org/10.15372/SJFS20200605>
23. *Petrov K.A., Sofronova V.E., Bubyakina V.V., Perk A.A., Tatarinova T.D., Ponomarev A.G., Chepalov V.A., Okh-lopkova Zh.M., Vasilieva I.V., Maximov T.Chr.* Woody plants of Yakutia and low-temperature stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. P. 1011. <https://doi.org/10.1134/S1021443711060148>
24. *Tatarinova T.D., Perk A.A., Bubyakina V.V., Vasilieva I.V., Ponomarev A.G., Maximov T.C.* Dehydrin stress proteins in *Pinus sylvestris* L. needles under conditions of

- extreme climate of Yakutia // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. V. 473. P. 98.
<https://doi.org/10.7868/S0869565217080242>
25. Chang C.Y., Fréchet E., Unda F., Mansfield S.D., Ensminger I. Elevated temperature and CO₂ stimulate late-season photosynthesis but impair cold hardening in pine // Plant Physiol. 2016. V. 172. P. 802.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.0075>
 26. Тимофеев П.А. Деревья и кустарники Якутии. Якутск: Бичик, 2003. 64 с.
 27. Уткин А.И. Леса Республики Саха (Якутия) – феномен таежного пояса северной Евразии // Хвойные бореальной зоны. 2006. Т. 23. № 3. С. 7.
 28. Миронов П.В., Левин Э.Д. Переохлаждение и обезвоживание хвойных зачатков в зимующих почках лиственницы сибирской // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 695.
 29. Ваганов Е.А., Круглов В.Б. Экология древесных растений. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2007. 229 с.
 30. Bubyakina V.V., Tatarinova T.D., Ponomarev A.G., Perk A.A., Solomonov N.G. Characteristics of seasonal dynamics of *Betula platyphylla* Sukacz. dehydrins associated with frost hardiness development under the cryolitic zone conditions // Dokl. Biol. Sci. 2011. V. 439. P. 258.
<https://doi.org/10.1134/S0012496611040193>
 31. Ponomarev A.G., Tatarinova T.D., Perk A.A., Vasilieva I.V., Bubyakina V.V. Dehydrins associated with the development of frost resistance of Asian white birch // Russ. J. Plant Physiol. 2014. V. 61. P. 105.
<https://doi.org/10.1134/S1021443713060095>
 32. Tatarinova T.D., Bubyakina V.V., Vetchinnikova L.V., Perk A.A., Ponomarev A.G., Vasilieva I.V. Dehydrin stress proteins in birch buds in regions with contrasting climate // Cell Tissue Biol. 2017. V. 11. P. 483.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17060098>
 33. Перк А.Я., Перк А.А. Изучение морозоустойчивости плодово-ягодных растений методом электропроводности // Исследование биологических ресурсов в Якутии. Якутск: изд-во ЯФ СО РАН СССР, 1978. С. 54.
 34. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.
 35. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
 36. Timmons T.M., Dunbar B.S. Protein blotting and immunodetection // Meth. Enzymol. 1990. V. 182. P. 679.
 37. Vornam B., Gailing O., Derory J., Plomion C., Kremer A., Finkeldey R. Characterization and natural variation of a dehydrin gene in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. // Plant Biol. 2011. V. 13. P. 881.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00446.x>
 38. Karlson D.T., Zeng Y.V.E., Stirm R., Joly J., Ashworth E.N. Photoperiodic regulation of a 24-kDa dehydrin-like protein in red-osier dogwood (*Cornus sericea* L.) in relation to freeze-tolerance // Plant. Cell. Physiol. 2003. V. 44. P. 25.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcg006>
 39. Rinne P., Welling A., Kaikuranta P. Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype // Plant Cell Environ. 1998. V. 21. P. 601.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00306.x>
 40. Strimbeck G.R., Schaberg P.G., Fossdal C.G., Schroder P.W., Kjellsen T.D. Extreme low temperature tolerance in woody plants // Front. Plant Science. 2015. V. 6. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00884>

САЛИЦИЛОВАЯ КИСЛОТА ПОВЫШАЕТ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬ РЕГЕНЕРАНТОВ *Solanum tuberosum*, РЕГУЛИРУЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. И. Ф. Головацкая^а, *, М. К. Кадырбаев^а, Е. В. Бойко^а, М. В. Филонова^а

^а Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

*e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Поступила в редакцию 09.01.2023 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 27.01.2023 г.

Изучена роль предстрессовой обработки корней салициловой кислотой (SA) в регуляции морфобиологических параметров, характеризующих холодоустойчивость растений-регенерантов картофеля (*Solanum tuberosum* L.). Установлено, что растения картофеля, подвергшиеся воздействию низких положительных температур (4°C, 3 сут), при переносе в благоприятные условия (22°C, 10 сут) не смогли восстановить исходные ростовые параметры (высота растений, площадь листовой поверхности, количество столонов, масса органов) и окислительный статус (интенсивность перекисного окисления липидов) корней и листьев. Кратковременная предварительная обработка корней 0.1 мкМ SA в течение 4 ч минимизировала пагубное воздействие отложенного охлаждения на растения. Обработка SA способствовала восстановлению исходного фенотипа растений после гипотермии, что привело к увеличению параметров роста (количество и площадь поверхности листьев, количество столонов) по сравнению с растениями, подвергшимися гипотермии без обработки SA. Показано, что предварительная обработка SA повышает холодоустойчивость растений картофеля за счет изменения активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и гваякол-зависимой пероксидазы) и уровня неферментативных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, антоцианов, общего количества флавоноидов и фенольных соединений). В зависимости от условий SA изменяет соотношение отдельных флавоноидов в листе. Неоднозначная реакция на холод и обработку SA наблюдалась у двух линий регенерантов картофеля, полученных при микроклонировании *in vitro* из апикальной и средней части побега растения, что вероятно опосредовано неодинаковым гормональным статусом.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, антиоксидантная система, рост, салициловая кислота, холодоустойчивость

DOI: 10.31857/S0015330323600018, **EDN:** PZVPIV

ВВЕДЕНИЕ

В связи с изменением и нестабильностью климата все чаще нарушается температурный режим регионов выращивания продовольственных культур. Прежде всего, это касается возвратного понижения температуры, снижающего урожайность хозяйственно ценных растений, среди которых картофель занимает одно из ведущих мест. Для решения проблемы повышения холодоустойчивости необходимо изучить механизмы защиты растений от переохлаждения. При этом необходимо учитывать величину стрессового фактора, связанного

как с продолжительностью и величиной гипотермии, так и с возможностью восстановления растений в благоприятных условиях. Различают краткосрочное и долгосрочное действие стресс-фактора [1, 2]. В первом случае, при наступлении благоприятных условий для роста, растения могут быстро восстановиться (адаптироваться) и реализовать потенциальную продуктивность, во втором случае возможность полной реабилитации снижается. Оценка холодоустойчивости часто проводится по степени повреждения морфобиологических параметров сразу действия стрессового фактора, но при этом не учитываются регенерационные особенности растений, определяющие степень восстановления конститутивных параметров при наступлении благоприятных условий.

Сокращения: АК – аскорбиновая кислота; Ант – антоцианы; AP – апикальный регенерант; ГПО – гваякол-зависимая пероксидаза; СОД – супероксиддисмутазы; СР – средний регенерант; Фл – флавоноиды; ФС – фенольные соединения; SA – салициловая кислота.

Фитогормоны выступают в роли регуляторов жизнедеятельности растений, среди которых важное место занимает гормон фенольной природы салициловая кислота (SA). SA (2-гидроксибензойная кислота) относится к фитогормонам, регулирующим метаболизм растений, а также к сигнальным молекулам, необходимым для экспрессии генов, участвующих в защитных реакциях растений. SA воспринимается двумя классами рецепторов, NPR1 (NONEXPRESSER OF PR GENES1) и NPR3/NPR4 (NPR1-LIKE PROTEIN 3/4), которые регулируют индуцированную SA экспрессию генов защиты, играя важную роль в иммунитете растений. Связывание SA отменяет репрессивную транскрипционную активность NPR3/NPR4 и усиливает транскрипционную активность NPR1, что приводит к усилению SA-чувствительных регуляторов защиты [3].

SA участвует в различных физиологических процессах растений, включая регуляцию движения клеток устьиц, фотосинтеза, прорастания семян, цветения, термотолерантности и засухоустойчивости. Было показано, что SA участвует в повышении уровня и активности ферментативных и неферментативных антиоксидантов [4–6].

SA активизирует процессы, ответственные за повышение устойчивости к холоду у растений огурца [7]. Обработка SA листьев увеличивает скорость фотосинтеза, эффективность карбоксилирования, активность нитрат-редуктазы и карбоангидразы, а также урожайность семян у *Brassica juncea* [8]. Уровень эндогенной SA изменяется в ходе онтогенеза растений и под воздействием стрессовых факторов [9].

Нас интересовало, может ли предварительная обработка SA изменить восприимчивость растений к отсроченной гипотермии и способность восстанавливать конститутивные параметры в благоприятных условиях. Мы исходили из предположения, что холодоустойчивые растения, реализуя свой защитный потенциал, не повреждаются или легко восстанавливаются при переносе их в благоприятные условия. Если защитный потенциал невелик у активно растущих растений, то система защиты может срабатывать только при действии экзогенного стресс-гормона.

В большинстве работ, изучающих формирование холодоустойчивости, оцениваются изменения, происходящие в растениях непосредственно после действия фактора. Такой подход позволяет расшифровать механизм формирования стресса. Однако сельхозпроизводителей больше интересует возможность восстановления растений после действия стрессора, позволяющая сохранить высокую продуктивность растений.

В связи с этим целью наших исследований было установить возможный диапазон безвозвратных повреждений после действия гипотермии и

диапазон реакций восстановления растений картофеля с различным потенциалом роста в норме и после дострессовой обработки SA. Было определено влияние обработки корней салициловой кислотой на ростовые процессы и системы антиоксидантной защиты у культивируемых *in vitro* растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили две линии растений-регенерантов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) среднераннего сорта Луговской, полученные методом микроклонирования из среднего и апикального ярусов побега и имеющие различный потенциал роста при регенерации микроклонов [10]. Выбор сорта был обусловлен его повышенной холодостойкостью и возможностью выращивания в районах с умеренным климатом, простирающихся от Северо-Запада до Дальневосточного региона России.

Полученные путем клонирования 28-дневные средние (CP) и апикальные (AP) регенеранты были адаптированы в течение 14 сут к жидкой 50% MC-среде без сахарозы (рис. 1). Корни одной половины растений обрабатывали в течение 4 ч раствором MC-среда + 0.1 мкМ SA (эксперимент 1, CP_{SA}, AP_{SA}), а другую половину выдерживали такое же время в MC-среде (контроль, CP_K, AP_K). Затем все растения отмывали от гормонов или старой среды, переносили в свежую MC-среду и выращивали в течение 7 сут, давая возможность гормону реализовать свои функции. Затем часть необработанных и обработанных SA растений (контроль и эксперимент 1) помещали в условия пониженной температуры 4°C на 3 сут (эксперимент 2, CP + S, AP + S), а другую часть (контроль и эксперимент 1) оставляли в оптимальных условиях (22°C) на 3 сут. После этого все растения были перенесены в оптимальные условия (22°C) на 10 сут для оценки их способности восстанавливаться после отсроченной гипотермии и, следовательно, холодоустойчивости.

В течение всего эксперимента растения выращивали на свету при плотности потока фотонов 200–230 мкмоль/(м² с), при 16-часовом фотопериоде и температуре воздуха 20–22°C. Источниками света служили белые люминесцентные лампы TL-D 58W/54-765 G13 (Philips, Польша) и L36/765 G13 (OSRAM, Россия) в соотношении 1 : 1. Плотность потока фотонов измеряли с помощью спектрометра AvaSpec-102/256/1024/2048 версии 6.2 (Avantes BV, Нидерланды).

В конце эксперимента определяли ростовые и биохимические параметры растений-регенерантов картофеля. Одну часть свежих растений сразу использовали для измерения ростовых параметров, содержания фотосинтетических пигментов, малонового диальдегида (МДА), свободного про-

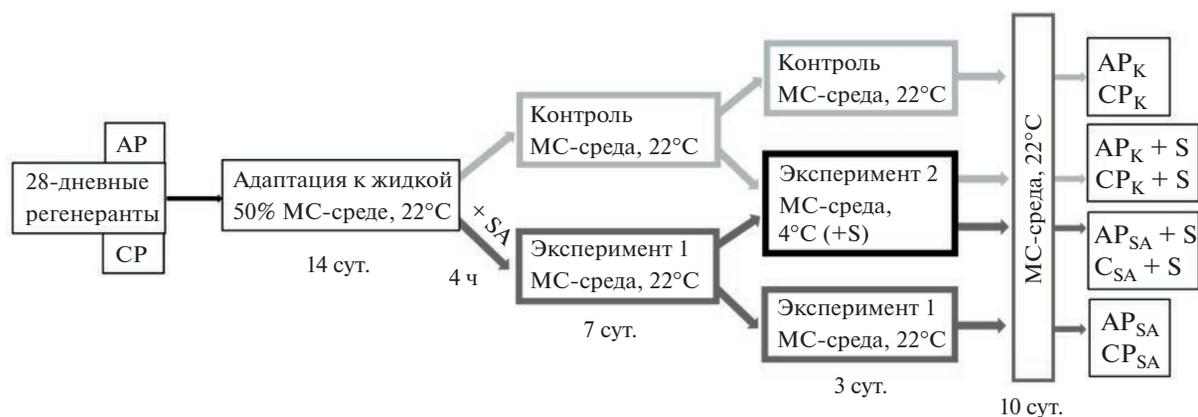


Рис. 1. Схема культивирования регенерантов *S. tuberosum* в оптимальных условиях (22°C) и на холоде (+S, 4°C) с предварительной обработкой салициловой кислотой (SA) и без нее. AP – апикальные регенеранты; CP – средние регенеранты.

лина и аскорбиновой кислоты (АК), другую часть фиксировали жидким азотом для измерения активности ферментов, третью часть высушивали для оценки содержания сухой массы и антиоксидантов фенольной природы.

Используя гравиметрический метод, определяли свежую (FW) и абсолютно сухую (DW) биомассу регенерантов. Измерение площади поверхности листьев проводили с помощью программы “Moticam 2300” (Испания) по фотографиям. В ходе эксперимента подсчитывали количество столонов и ярусов у побегов растений-регенерантов картофеля.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию МДА, по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [11]. Для этого образец листьев или корней измельчали в 20% растворе трихлоруксусной кислоты. Экстракт центрифугировали (Центрифуга Eppendorf 5430R, Германия) в течение 15 мин при 12000g и температуре 4°C. Цветную реакцию аликвоты супернатанта с ТБК проводили при 98°C в течение 30 мин. Оптическую плотность раствора с образовавшимся розовым хромогеном измеряли при двух длинах волн – 532 и 600 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США).

Уровень свободного пролина (Про) определяли по реакции с нингидрином в кислой среде [12] и измерению оптической плотности раствора при 520 нм.

Содержание АК определяли по оптической плотности растительного экстракта с метафосфорной кислотой при 265 нм [13].

Содержание фотосинтетических пигментов (каротиноидов (Carot), хлорофилла *b* (Chl *b*) и хлорофилла *a* (Chl *a*)) определяли в спиртовых (96% этанол) экстрактах спектрофотометрически при длинах волн 470, 644 и 662 нм, соответствен-

но, и рассчитывали по формулам, предложенным Lichtenthaler [14].

Определение суммарного содержания антоцианов (Ант) проводили по оптической плотности экстракта, полученного с 1% соляной кислотой, при 530 и 657 нм относительно эталонного раствора – 1% соляной кислоты. Рассчитывали суммарное содержание Ант в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид и DW [15].

Определение суммарного содержания флавоноидов (Фл) основано на их комплексообразовании с хлоридом алюминия и последующем измерении оптической плотности окрашенных растворов при 415 нм [16]. Суммарное содержание Фл рассчитывали в пересчете на рутин и DW.

Количественное определение Фл проводили методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity с детектором на диодной матрице DAD (Agilent Technologies Inc., США). Использовали оригинальную колонку Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 мм × 100 мм × 3.5 мкм. Обнаружение пиков проводили в диапазоне 190–390 нм. Длина волны обнаружения рутина составила 254 нм; кверцетина – 290 нм; дигидрокверцетина – 360 нм. Разделение проводили с использованием смеси ацетонитрила и 0.04 М калия фосфорнокислого монозамещенного с ортофосфорной кислотой в качестве подвижной фазы (pH 2.8). Скорость потока элюента составила 0.25 см³/мин. Содержание Фл в каждом экстракте определяли путем сравнения времени удерживания и УФ-спектров образцов с данными стандартов: рутина гидрат (содержание основного вещества более 95%) (Merck, Германия); кверцетин (содержание основного вещества не менее 98%) (Россия); дигидрокверцетин (содержание не менее 90%, ГОСТ 33504) (Россия). Точный образец (около 1 г) абсолютно сухого растительного сырья экстрагировали 70% раствором этилового спирта (10–20 мл, в зависи-

мости от образца). Колбу присоединяли к рефлюкс-конденсатору и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После охлаждения фильтровали через целлюлозный фильтр [17].

Растворимые фенольные соединения (ФС) определяли по методу Фолина-Дениса [18]. Оптическую плотность раствора измеряли при 725 нм против контроля, содержащего этанол вместо этанолового экстракта. Суммарное содержание ФС рассчитывали в пересчете на рутин и DW.

Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли по световой (232 ± 5 мкмоль/(м² с)) реакции 100 мкл супернатанта со смесью, содержащей 1.75 мл 50 мМ Трис-НСl-буфера (рН 7.8), 0.2 мл 0.1 М DL-метионина, 0.063 мл 1.7 мМ нитросинего тетразолия (Fermentas, США), 0.047 мл 1% Triton X-100 и 0.060 мл 0.004% рибофлавина, в течение 30 мин [19]. Оптическую плотность раствора измеряли при 560 нм.

Активность гваякол-зависимой пероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.7) определяли по реакции 50 мкл супернатанта с реакционной смесью, содержащей 1.95 мл 0.066 М калий-фосфатного буфера (рН 7.4), 200 мкл 7 мМ гваякола и 200 мкл 0.01 М Н₂O₂ [20]. Оптическую плотность раствора измеряли при 470 нм.

Концентрацию белка в полученных ферментативных препаратах оценивали по методу Esen [21]. Для этого растительный экстракт (5 мкл) наносили на хроматографическую бумагу (Whatman, Англия), высушивали и окрашивали в растворе Coomassie R-250 в течение 1 ч. Бумагу промывали дистиллированной водой и высушивали. Окрашенные участки вырезали, элюировали 1% раствором додецилсульфата натрия в воде и экстрагировали при перемешивании на шейкере в течение 1 ч. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре при 600 нм.

Для сравнения параметров использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента и непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни для попарного сравнения групповых параметров. На рисунках представлены средние арифметические (*M*) значения для роста ($n = 20$) и биохимических ($n = 5$) параметров с двухсторонними доверительными интервалами ($M \pm 1.96SEM$). Различия между значениями, отмеченными разными надстрочными латинскими буквами, были статистически значимыми при $P \leq 0.05$. Эксперимент был повторен дважды.

РЕЗУЛЬТАТЫ

SA регулирует рост средних и апикальных регенерантов

Сравнение параметров роста CP_K и AP_K , выращенных в оптимальных условиях (22°C), показало, что удлинение стебля и накопление биомассы пре-

обладали у AP_K , в то время как другие параметры были снижены по сравнению с CP_K (рис. 2а, б). Предварительная обработка SA в оптимальных условиях способствовала изменению соотношения ростовых показателей отдельных органов: увеличению длины корней и площади листовой поверхности и уменьшению длины и массы стебля AP_{SA} . В то же время у CP_{SA} наблюдали увеличение длины и массы стебля, массы и площади листовой поверхности. Сравнение сырой и сухой массы органов показало увеличение содержания воды в корнях и стеблях AP_{SA} по сравнению с CP_{SA} (рис. 2в). Во время роста после действия SA содержание воды в корне и стебле AP_{SA} уменьшилось, но сохранялось в листе. Реакция CP_{SA} на действие SA была иной: SA увеличивала содержание воды в корнях, но снижала содержание воды в листьях CP_{SA} .

Восстановление параметров роста растений ($CP_K + S$, $AP_K + S$) в оптимальных условиях через 10 сут после гипотермии не произошло, что указывало на сильное повреждающее действие стрессового фактора. Сырая масса корня, стебля и листьев, площадь листовой поверхности уменьшилась в разы (рис. 2б). Линейные параметры корня и стебля изменились меньше, в то время как количество столонов, важный показатель продуктивности картофеля, значительно снизилось (рис. 2а). Гипотермия оказала наибольшее повреждающее действие на реакции дифференциации стебля (количество ярусов и столонов) у $AP_K + S$. Ингибирование роста происходило на фоне снижения содержания воды в органах необработанных растений ($CP_K + S$, $AP_K + S$) (рис. 2б).

Предварительная обработка SA привела к повышению относительного содержания воды во всех органах $CP_{SA} + S$ и $AP_{SA} + S$ после отсроченной гипотермии (рис. 2в). При этом у $CP_{SA} + S$ наблюдали полное восстановление водного статуса, характерного для неподвергавшихся стрессу растений. В то время как у $AP_{SA} + S$ сохранялось более низкое содержание воды в корнях и побегах. SA привела к активному растяжению корней и стеблей у обеих линий регенерантов. Наряду с этим у $CP_{SA} + S$ увеличилась длина корней и площадь листовой поверхности, тогда как у $AP_{SA} + S$ — количество ярусов и столонов на побеге (рис. 2а, б). Масса стебля, корня и листьев увеличилась в 2, 3 и 5 раз соответственно у растений $CP_{SA} + S$, а площадь листовой поверхности увеличилась в 3 раза по сравнению с необработанными SA растениями после гипотермии. SA корректировала многие негативные реакции роста у $AP_{SA} + S$ в ответ на охлаждение. Однако действие SA не смогло полностью восстановить все контрольные параметры растений. У $CP_{SA} + S$ SA не смогла восстановить конститутивное количество столонов и ярусов,

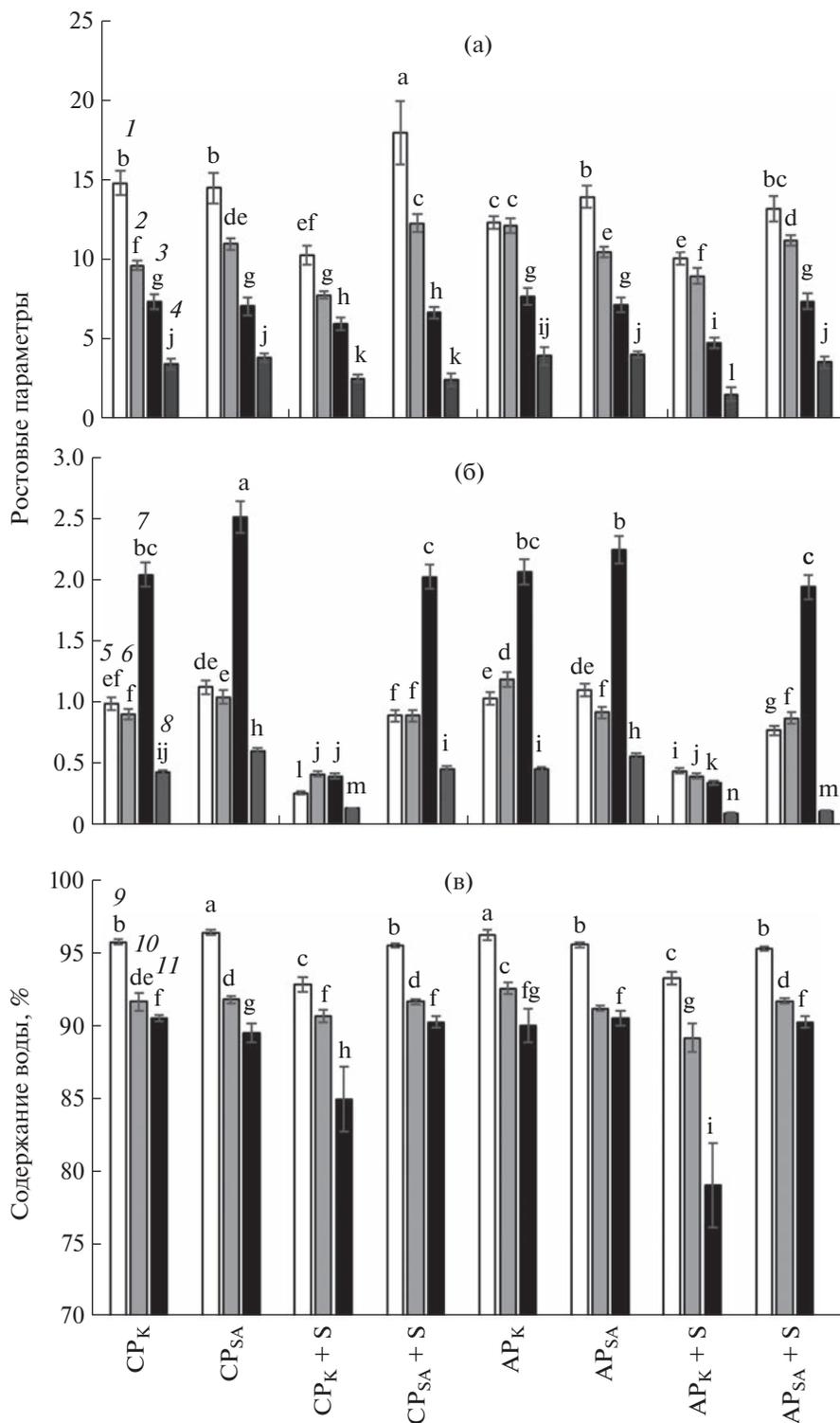


Рис. 2. Влияние салициловой кислоты (SA) на параметры роста (а, б) и относительное содержание воды (в) в средних (CP) и апикальных (AP) регенерантах *S. tuberosum* в норме и после действия отсроченной гипотермии. 1 – длина корня, см; 2 – длина стебля, см; 3 – количество ярусов; 4 – количество столонов; 5 – сырая масса корня, г; 6 – сырая масса стебля, г; 7 – сырая масса листьев, г; 8 – площадь листа, см²; 9 – корень; 10 – стебель; 11 – лист. Разные латинские буквы указывают на статистически значимые различия между средними значениями при $P \leq 0.05$. Одинаковые буквы указывают на отсутствие значимых различий.

Таблица 1. Влияние салициловой кислоты (SA, 0.1 мкМ) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях средних (CP) и апикальных (AP) регенерантов картофеля в норме и после отсроченной гипотермии (+S)

Вариант	Содержание, мг/г DW		
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Carot
CP _K	19.71 ± 1.27 ^b	4.47 ± 0.28 ^b	4.78 ± 0.32 ^{ab}
CP _{SA}	20.52 ± 0.50 ^b	4.59 ± 0.14 ^b	4.57 ± 0.19 ^b
CP _K + S	15.16 ± 1.53 ^d	3.70 ± 0.53 ^c	3.85 ± 0.29 ^c
CP _{SA} + S	23.85 ± 1.17 ^a	5.71 ± 0.36 ^a	5.63 ± 0.30 ^a
AP _K	19.01 ± 0.28 ^c	4.56 ± 0.14 ^b	4.67 ± 0.10 ^b
AP _{SA}	22.58 ± 0.76 ^a	5.01 ± 0.25 ^{ab}	5.10 ± 0.20 ^a
AP _K + S	9.07 ± 0.26 ^e	1.96 ± 0.11 ^d	2.06 ± 0.07 ^d
AP _{SA} + S	19.48 ± 1.32 ^b	4.63 ± 0.24 ^b	4.46 ± 0.31 ^b

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

тогда как у AP_{SA} + S – сырую массу всех органов и площадь листовой поверхности.

Наибольшую эффективность в регуляции роста SA показала при регенерации растений после гипотермии, чем в оптимальных условиях.

Влияние SA на содержание фотосинтетических пигментов

Состояние фотосинтетического аппарата характеризовалось одинаковым содержанием Chl *a*, Chl *b* и Carot в листьях обеих линий-регенерантов (CP_K и AP_K) (табл. 1). Однако у CP_K и AP_K была отмечена различная чувствительность к гипотермии и действию SA. У AP наблюдали большую чувствительность фотосинтетического аппарата к действию гипотермии и SA, но разной направленности.

Обработка SA в оптимальных условиях существенно не изменила уровень пигментов в листьях среднего яруса побега CP_{SA}. После гипотермии наблюдалось снижение уровня Carot на 20% в листьях CP_K + S по сравнению с контрольным CP_K без охлаждения. Более низкий каротиноидный статус был ответственен за снижение Chl *a* и Chl *b* на 23 и 17% соответственно. Это означало, что, несмотря на благоприятные условия после гипотермии у CP_K+S восстановление конститутивных уровней пигментов не произошло. В то же время, предварительная обработка SA привела к увеличению уровня Carot на 18% в листьях CP_{SA} + S по сравнению с контролем без охлаждения, что способствовало увеличению на 21 и 28% соответственно уровня Chl *a* и Chl *b*. Эти данные свидетельствовали о повышении содержания фотосинтетических пигментов за счет регуляции SA уровня Carot, выполняющих антиоксидантную функцию.

Действие SA на AP_{SA} в благоприятных условиях увеличивало уровни Carot и Chl *b* на 10%, а Chl *a* – на 19%. Повреждающее действие гипотермии на уровень пигментов было выше у AP_K + S, что вызвало снижение уровней всех групп пигментов в 2–2.3 раза по сравнению с уровнями пигментов в оптимальных условиях. Предварительная обработка SA увеличивала содержание Carot, Chl *a* и Chl *b* у AP_{SA} + S в 2.2 раза относительно уровней AP_K + S, восстанавливая конститутивный уровень пигментов.

SA регулирует окислительный статус корней и листьев регенерантов

Функциональная специфика корня регенерантов картофеля проявлялась в более низком содержании МДА – продукта ПОЛ, по сравнению с листом (рис. 3). Такие различия могли быть обусловлены процессами, происходящими в этих органах. Более высокий окислительный статус у листьев, вероятно, связан с большей продукцией АФК в процессе фотосинтеза и дыхания, тогда как более низкий у корней обусловлен только дыханием.

При сравнении линий регенерантов отметили более низкий окислительный статус листьев AP_K по сравнению с таковым листьев CP_K (рис. 3). Низкая концентрация SA, которой были обработаны корни, в оптимальных условиях не изменила окислительный статус ни корня, ни листа. После действия охлаждения у линии CP_K + S отмечена тенденция к увеличению МДА, тогда как у линии AP_K + S даже после 10 сут сохранялся высокий окислительный статус корня и листа. Предварительная обработка корней SA перед отсроченной гипотермией снижала интенсивность ПОЛ до конститутивного уровня в AP_{SA} + S и еще сильнее в CP_{SA} + S.

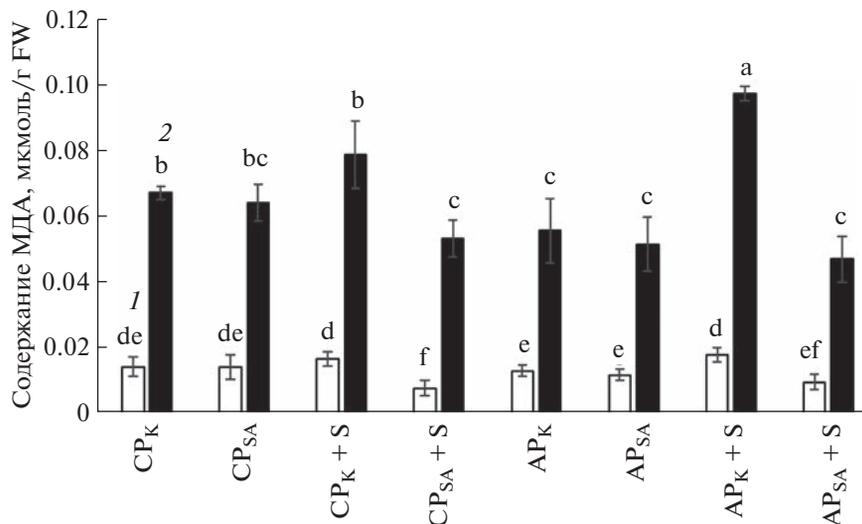


Рис. 3. Влияние салициловой кислоты (SA) на содержание малонового диальдегида (МДА) в корнях (1) и листьях (2) средних (CP) и апикальных (AP) регенерантов *S. tuberosum* в норме и после отсроченной гипотермии (+S, 4°C, 3 сут). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

Сравнение уровня фотосинтетических пигментов и содержания МДА показало, что большее повреждение пигментов в листе AP_K + S (см. табл. 1) происходило при высокой интенсивности ПОЛ (рис. 3).

SA регулирует антиоксидантный статус листьев регенерантов

Антиоксидантная система, представленная ферментативными и неферментативными компонентами, рассматривается в качестве механизма, контролирующего накопление АФК в стрессовых условиях [22]. Несмотря на этот факт, накопление АФК происходило и в оптимальных условиях выращивания растений-регенерантов картофеля.

Исследуемые линии регенерантов отличались по активности антиоксидантных ферментов. Несколько более высокую активность антиоксидантных ферментов наблюдали в листьях AP_K по сравнению с листьями CP_K (рис. 4а, б). Обработка SA многократно увеличивала активность СОД и ГПО у CP_{SA}, не изменяя ее в AP_{SA} (рис. 4а, б). Во время восстановления после гипотермии листьев активность антиоксидантных ферментов оставалась высокой. Активность СОД была выше в листьях AP_K + S, тогда как ГПО – в листьях CP_K + S. Предварительная обработка корней SA изменила активность ферментов в листьях охлажденных растений, снизив в каждой линии их более активную группу (рис. 4а, б).

Различные линии регенерантов (контроль: CP_K, AP_K) характеризовались неодинаковым уровнем неферментативных антиоксидантов в оптимальных условиях. Более высокий уровень свободного

Про (рис. 5а), соответствующий более низкому окислительному статусу, наблюдали в листьях AP_K по сравнению с листьями CP_K (рис. 3). Предварительная обработка SA поддерживала конститутивный окислительный статус корней и листьев, но за счет разных реакций, поскольку у CP_{SA} уровень свободного Про увеличивался, а у AP_{SA} уменьшался. На фоне снижения уровня свободного Про в AP_{SA} повышался уровень АК (рис. 5а, б). В период регенерации после гипотермии у CP_K + S окислительный статус стабилизировался на фоне взрывного увеличения уровня свободного Про в листе и снижения уровня в корне, а также снижения уровня АК. В отличие от CP_K + S, у AP_K + S сохранялась повышенная интенсивность ПОЛ в корне и листьях (рис. 3), несмотря на увеличение уровня Про и АК (рис. 5а, б). В то же время уровень Про в корнях и листьях обеих линий снижился. Наибольший стабилизирующий эффект SA мог проявиться в результате действия окислительно-восстановительных систем, вызывающих снижение уровня АК.

Уровень неферментативных антиоксидантов фенольной природы варьировал от линии к линии. Содержание Ант было одинаковым в листьях обеих линий, в то время как суммарное содержание Фл и ФС было выше в листьях CP_K, чем в листьях AP_K (рис. 6а, б, в). Обработка SA увеличивала уровень Ант в листьях обеих линий, не изменяя суммарного содержания Фл и ФС относительно собственных контролей (рис. 6а, б, в).

Во время восстановления регенерантов после гипотермии содержание Ант снижалось в листьях AP_K + S на фоне увеличения суммы ФС, между тем как суммарное содержание ФС снижалось в

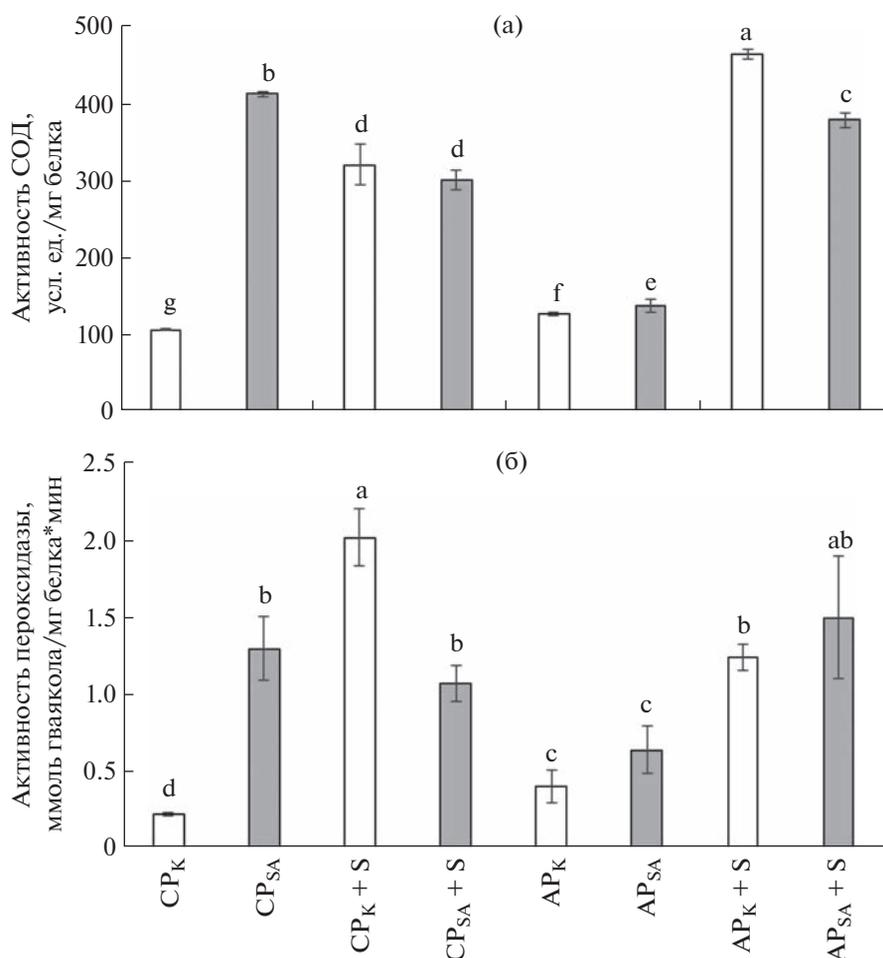


Рис. 4. Влияние салициловой кислоты (SA) на активность СОД (а) и гваякол-зависимой пероксидазы (б) в листьях средних (СР) и апикальных (АР) регенерантов *S. tuberosum* в нормальных условиях и после отсроченной гипотермии (+S, 4°C, 3 сут). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

листьях СР_K + S по сравнению с неохлажденными растениями (рис. 6а, б, в). Предварительная обработка корней SA увеличивала уровни Ант и Фл в листьях обеих линий (AP_{SA} + S, CP_{SA} + S), однако уровень ФС повышался только в листьях СР_{SA} + S по сравнению с СР_K + S.

Установленные физиологические и биохимические реакции при восстановлении растений-регенерантов картофеля после гипотермии показывают глубину их повреждения и широту защитной системы, в которой SA в низкой концентрации играет существенную регуляторную роль.

ОБСУЖДЕНИЕ

Продуктивность растительных организмов зависит от эндогенных и экзогенных факторов. Низкие температуры и возникающий при этом дефицит воды сильно подавляют ростовые процессы, снижая продуктивность растений из-за

уменьшения размера и количества структурных элементов. Низкие температуры вызывают многочисленные стрессы у растений, среди которых наиболее значимым является окислительный стресс, влияющий на восстановительные процессы в нормальных условиях [23]. Действие низкой температуры вызывает многочисленные повреждения, среди которых отмечается повреждение мембран, выявленное у проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) по увеличению выхода электролитов и накоплению МДА [7]. В ответ на воздействие низкой температуры было показано повреждение тилакоидов в хлоропластах растений *Hypericum perforatum* L., а также активация генов, кодирующих антиоксидантные ферменты каталазу (КАТ) и СОД [23]. При этом изоформы Cu/ZnСОД оказались наиболее чувствительными [23]. Еом с соавт. [24], исследуя молекулярный механизм, лежащий в основе ответов растений капусты на умеренный холодовой стресс, показали увеличение экспрессии 936 генов и снижение экспрессии 1195 генов. В то

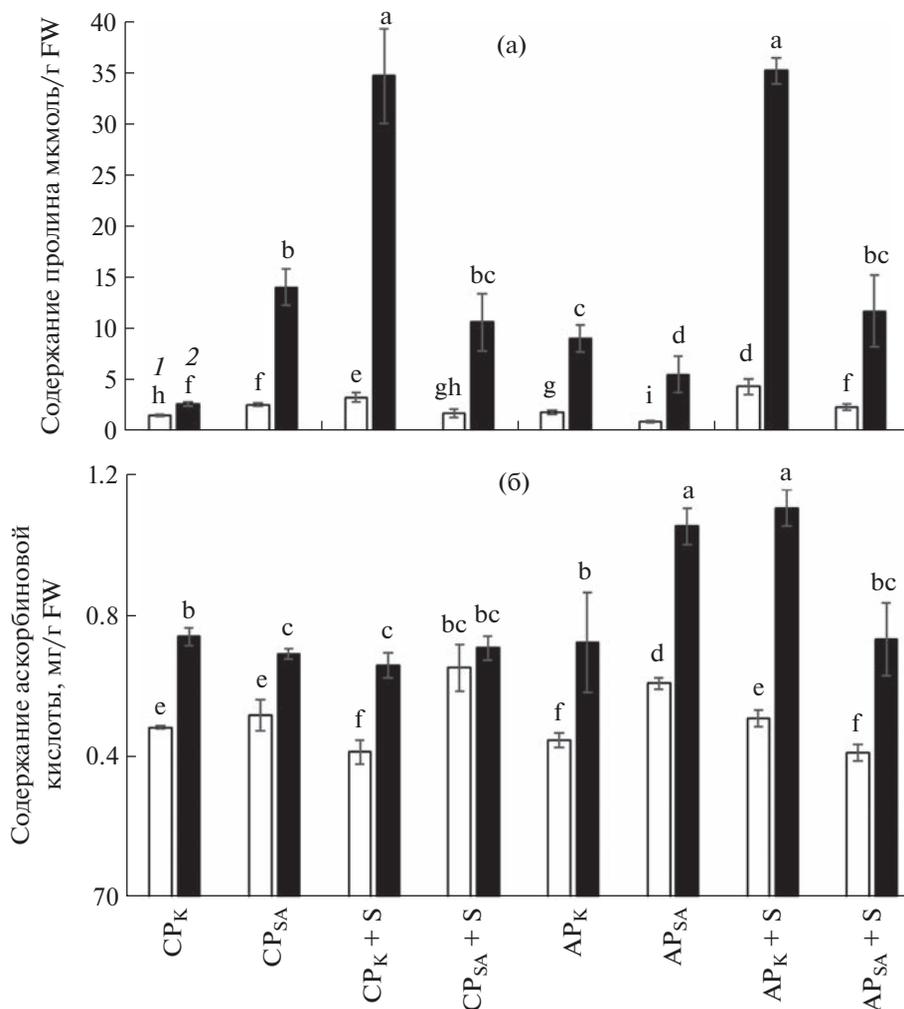


Рис. 5. Влияние салициловой кислоты (SA) на содержание свободного пролина (а) и аскорбиновой кислоты (б) в корнях (1) и листьях (2) средних (CP) и апикальных (AP) регенерантов *S. tuberosum* в норме и после отсроченной гипотермии (+S, 4°C, 3 сут). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

же время умеренный холодовой стресс индуцировал фенолпропаноидный путь, вызывая накопление полифенольных соединений (п-кумаровой, феруловой и синаповой кислот). Показано также, что низкотемпературный стресс индуцировал существенное снижение содержания ИУК и цитокининов в 4-дневных проростках пшеницы [25].

Регенерация растений картофеля после гипотермии была специфичной для разных линий. Окислительное повреждение мембран, вызванное ПОЛ, было ослаблено во время регенерации корней и листьев CP_K+S, но оставалось на высоком уровне в органах AP_K+S. Более значительный отрицательный эффект гипотермии на уровень фотосинтетических пигментов в AP_K+S соответствовал повышенному окислительному статусу листьев этой линии регенерантов. Несмотря на конститутивный уровень ПОЛ в листьях CP_K+S,

активность антиоксидантных ферментов оставалась высокой. Активность СОД была выше в листьях AP_K+S, в то время как ПОЛ было выше в листьях CP_K+S. Неодинаковая активность ферментов СОД и ГПО может свидетельствовать о преобладании различных АФК в двух линиях регенерантов. Другие авторы, анализируя влияние умеренного холода (10°C) на активность антиоксидантных ферментов у растений капусты, отметили значительное снижение активности ГПО и КАТ с увеличением продолжительности холодового стресса (1 и 3 сут.), в то время как уровень активности СОД существенно не менялся [24].

Сохранение определенного уровня АФК обусловлено их разными функциями в растении. Недавно ученые связали роль АФК с функцией поддержания нормального роста растений и повышения их устойчивости к стрессу [26]. В то же

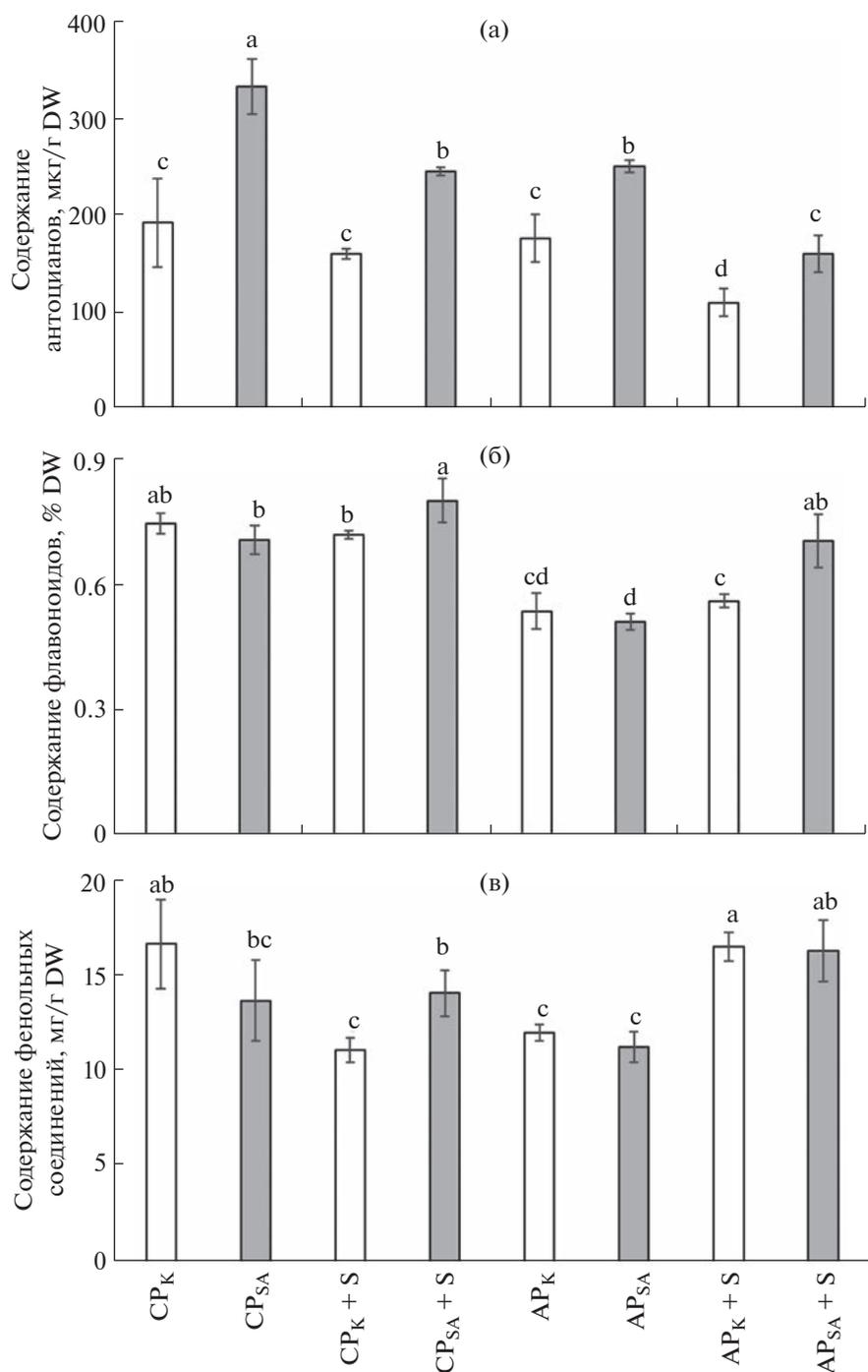


Рис. 6. Влияние салициловой кислоты (SA) на суммарное содержание антоцианов (а), флавоноидов (б) и фенольных соединений (в) в листьях средних (CP) и апикальных (AP) регенерантов *S. tuberosum* в нормальных условиях и после отсроченной гипотермии (+S, 4°C, 3 сут). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

время во время стресса производство АФК не обязательно является симптомом клеточной дисфункции, но может представлять собой необходимый сигнал для адаптации клеточного механизма к измененным условиям. АФК может модулировать многие пути передачи сигнала, такие

как каскады митоген-активированных протеинкиназ, и в конечном итоге влиять на активность транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов [27].

В нашем эксперименте SA в низкой концентрации участвовала в восстановительных реакциях

Таблица 2. Влияние салициловой кислоты (SA, 0.1 мкМ) на содержание трех флавоноидов в листьях средних регенерантов (CP) картофеля в норме и после отсроченной гипотермии (+S)

Вариант	Содержание, мкг/г DW		
	рутин	кверцетин	дегидрокверцетин
CP _K	58.0 ± 12.2 ^b	Менее 0.01 ^c	205.8 ± 43.2 ^a
CP _{SA}	51.4 ± 10.8 ^b	11.85 ± 2.49 ^b	165.6 ± 34.8 ^a
CP _{SA} + S	122.4 ± 25.7 ^a	88.30 ± 18.50 ^a	109.8 ± 23.1 ^b

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

растений картофеля после действия отсроченной гипотермии. SA увеличивала содержание воды в корне, стебле и листьях CP_{SA} + S, что активировало ростовые процессы, включая рост листовой поверхности (рис. 2б), в условиях повышенного уровня осмотически активных веществ (Ант, Фл, ФС) (рис. 4б, г, д).

По нашим данным корневая обработка SA увеличивала водный и осмотический потенциалы и уровень фотосинтетических пигментов, что согласовывалось с данными Iqbal с соавторами [28], полученными при внекорневой обработке 0.5 мМ SA. Авторами показано также увеличение интенсивности фотосинтеза растений горчицы (*Brassica juncea* L.) за счет увеличения устьичной проводимости и содержания межклеточного CO₂ в условиях водного дефицита. SA ингибировала АБК-опосредованное закрытие устьиц.

В соответствии с нашими данными SA корректировала соотношение роста корней и стеблей, тем самым изменяя фенотип роста у AP_{SA} + S и CP_{SA} + S, вероятно, через изменения в уровнях эндогенных фитогормонов. Как показали другие авторы, SA является одним из наиболее важных фенольных фитогормонов, которые изменяют рост растений как в нормальных, так и в стрессовых условиях через взаимодействие с другими фитогормонами [5]. При совместном использовании SA и ИУК, SA и ГК усиливают рост и активность антиоксидантных ферментов, снижают утечку электролитов из мембран и генерацию АФК в стрессовых и нормальных условиях [5]. SA и этилен действуют антагонистически. SA в условиях стресса ингибирует биосинтез этилена. При сильном напряжении негативного фактора этилен действует как стрессовый гормон и повышает уровень АФК [29]. SA усиливает выработку АБК [5]. Совместное применение АБК и SA увеличивает дыхание и осмотическую защиту, соответственно. При водном стрессе SA усиливает активность и сигналы АБК, что индуцирует гены, участвующие в метаболизме сахара. SA и АБК играют взаимодополняющие роли в механизме движения закрытия устьиц. АБК активирует закрытие устьиц через протеинкиназы Ca²⁺ (CPKs), тогда как SA активирует опосредованный пероксидазой сигнал АФК [30]. АБК мо-

жет изменять ответ растений на абиотический (холодовой) стресс, связанный с SA. Обработка АБК вызывала изменения в содержании эндогенной SA, что позволяет предположить, что связанные с SA стрессовые реакции могут перекрываться с АБК-индуцированной холодной акклимацией [31].

В нашем исследовании в ходе восстановления растений после гипотермии предварительная обработка корней картофеля SA неоднозначно изменила активность антиоксидантных ферментов и уровень неферментативных антиоксидантов в листьях, по-разному определяя фенотип растений разных линий. Следует предположить, что адаптационные процессы происходили за счет биосинтеза разных представителей изученных групп антиоксидантов и, следовательно, неодинаковой регенеративной способности.

Например, ВЭЖХ-анализ состава Фл у листьев CP показал, что SA в оптимальных условиях увеличивала содержание кверцетина, тогда как после отсроченной гипотермии увеличивала содержание кверцетина в 8 раз и рутина в 2 раза за счет 2-кратного снижения уровня дигидрокверцетина (табл. 2). В соответствии с данными других авторов, все Фл проявили высокую активность в отношении ингибирования радикалов ⁻ОН и O²⁻. Кверцетин сильнее ингибировал ПОЛ и обладал более высокой радикал-защитной способностью, чем рутин [32]. Антиоксидантная активность, определяемая по значениям половины максимальной ингибирующей концентрации (IC50) трех Фл, уменьшается в следующем порядке: кверцетин > гиперин > рутин [33].

В соответствии с данными других авторов, предварительная обработка SA в концентрациях 50 и 100 мкМ, более высоких, чем в нашем исследовании, увеличивала стабилизацию мембран и способствовала накоплению свободного Про в листьях *C. sativus* [7], который играет защитную роль [34]. Стабилизация мембран при низкотемпературном закаливании (5°C, 6 сут) в листьях картофеля (*S. tuberosum*, сорт Десница) происходила за счет увеличения полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и линоленовой) [35].

Эффективность экзогенной SA зависела от ее концентрации. 50–500 мкМ SA активировали (в 1.5–2.5 раза) образование H_2O_2 при окислении сукцината митохондриями, выделенными из семян 5-дневных этиолированных проростков люпина (*Lupinus angustifolius* L.) [36]. В то же время, SA в низких концентрациях оказывала преимущественно разобщающий (активирующий) эффект на окисление сукцината в состоянии 4, а при увеличении его концентрации наблюдалось ингибирование дыхания в состоянии 3. SA оказывает прямое регулирующее действие на генерацию АФК митохондриями, защищая органеллы от окислительного стресса, а также способствуя их участию в формировании ответа растений на неблагоприятные факторы среды [36]. У растений огурца, обработанных SA и подвергшихся воздействию холода, повысилась активность СОД, КАТ и ГПО, а также увеличилось накопление транскриптов (CuZnSOD и CAT) кодирующих их генов по сравнению с контрольными растениями [37]. SA также стимулировала накопление N, Mg, Fe, Mn и Cu в растении кукурузы, подверженных солевому стрессу, что может оказывать влияние на осмотические и ростовые процессы [38].

Имеются и другие данные, показывающие, что обработка 1.0–5.0 мМ SA при оптимальной температуре усиливала выработку H_2O_2 , интенсивность ПОЛ и окислительное повреждение белков и приводила к образованию изомеров хлорофилла и каротина в течение 8 ч после обработки *Arabidopsis thaliana* генотипа Landsberg *erecta*. Уровни H_2O_2 , усиленные SA, были связаны с повышенной активностью Cu, Zn-СОД и не зависели от изменений активности КАТ и аскорбатпероксидазы [39]. Другие авторы действие высоких концентраций SA рассматривают в качестве отрицательного регулятора прорастания семян и связывают с развитием окислительного стресса [40].

В настоящее время предложено объяснение разного действия SA в растении, связанного с рецепторами гормона (NPR1 и NPR3/4), играющими противоположные роли в передаче сигналов SA: белки NPR1 активируют, а белки NPR3/4 подавляют SA-активируемый путь. При низких уровнях SA гены SAR (SA-responsive) слабо активируются комплексом NPR1-TGA, но сильно подавляются комплексом NPR3/4-TGA. При высоких уровнях SA гены SAR активируются комплексом NPR1-TGA. Между тем, связывание SA снимает опосредованную NPR3/4-TGA репрессию, дополнительно усиливая повышенную экспрессию генов SAR [41].

В ходе наших исследований применение обработки SA низкой концентрации 0.1 мкМ перед охлаждением обуславливало активацию многих процессов растений-регенерантов картофеля и,

прежде всего, определенного уровня защитных механизмов и координации ростовых процессов.

Вероятно, благодаря изменению функциональной активности клеток и соотношения ростовых процессов в разных органах поддерживался окислительный и водный градиент в растении, обеспечивая адаптационный потенциал растений. Предварительная обработка корней SA эффективно смягчала стресс, испытываемый растениями после охлаждения. Однако наблюдали различия в снижении стресса у разных линий регенерантов, что, вероятно, связано с разной интенсивностью их ростовых процессов и соответственно разным эндогенным гормональным статусом, который не позволяет быстро переключиться с ростовых реакций на защитные. Окислительный стресс в корне наиболее эффективно снижался под действием SA у $CP_{SA} + S$, в то время как восстановление роста и развития побега (образование столонов и закладка новых узлов с листьями) происходило лучше у $AP_{SA} + S$.

Показано изменение содержания Про в листьях, который может оказывать стабилизирующее действие на мембраны, снижать осмотический стресс, защищать белки от денатурации, участвовать в трансдукции стрессовых сигналов, регулировать редокс-потенциал клетки, участвовать в инактивации свободных радикалов, образуя с ними долгоживущие конъюгаты [34, 42]. В исходном контроле CP имели более высокий уровень Про, чем AP. Гипотермия привела к увеличению уровня Про по сравнению с контролем как у CP, так и у AP, что согласовывалось с данными других авторов, показавшими, что Про служит основным осмолитом для предотвращения потери воды в физиологической реакции растений на холодостресс [42]. Обработка SA снизила его уровень в листьях обеих линий регенерантов картофеля по сравнению с необработанными SA регенерантами. Это может указывать на активацию синтетических процессов, использующих Про, например, на синтез белков.

Полученные данные свидетельствуют о способности SA в низкой концентрации выполнять сигнальную функцию и активировать процессы, направленные на повышение холодостойкости растений картофеля и регенеративные процессы после отсроченной гипотермии. SA обладает защитным действием, которое выражается в активации ферментативных и неферментативных антиоксидантов, обеспечивающих снижение уровня окислительного статуса. В то же время SA влияет на изменение количественного и качественного состава ФС (в том числе ФЛ). Результатом таких метаболических модификаций является восстановление ростовых процессов, обеспечивающих восстановление листовой по-

верхности (фотосинтетического аппарата) и образование столонов.

Понимание физиологического механизма, с помощью которого картофель выходит из холодного стресса, является важным шагом для повышения устойчивости растений к холоду. Анализ антиоксидантной активности показал, что изменение активности ферментов и состава Фл, ответственных за разрушение индуцированных холодом АФК, является одним из ответов на холодовой стресс у картофеля. Согласно полученным результатам, качественный состав Фл подлежит более детальному изучению. Полученные результаты свидетельствуют о возможности разработки способа повышения устойчивости растений картофеля к гипотермии и их восстановления после действия стрессора.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Titov A.F., Shibaeva T.G., Ikkonen E.N., Sherudilo E.G. Plant responses to a daily short-term temperature drop: phenomenology and mechanisms // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 1003. <https://doi.org/10.1134/S1021443720060187>
2. Ikkonen E.N., Shibaeva T.G., Sherudilo E.G., Titov A.F. Reaction of respiration of winter wheat seedlings to prolonged and short daily decrease in temperature // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 312. <https://doi.org/10.31857/S0015330320020062>
3. Liu Y., Sun T., Sun Y., Zhang Y., Radojičić A., Ding Y., Tian H., Huang X., Lan J., Chen S., Orduna A.R., Zhang K., Jetter R., Li X., Zhang Y. Diverse roles of the salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in plant immunity // *Plant Cell.* 2020. V. 32. P. 4002. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00499>
4. Kumar D. Salicylic acid signaling in disease resistance // *Plant Sci.* 2014. V. 228. P. 127. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.014>
5. Arif Y., Sami F., Siddiqui H., Bajguz A., Hayat S. Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: a study towards physiology and signal transduction under challenging environment // *Environ. Exp. Bot.* 2020. V. 175. P. 104040. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104040>
6. Сахабутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Шакирова Ф.М. Влияние салициловой кислоты на активность антиоксидантных ферментов у пшеницы в условиях засоления // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2004. Т. 40. С. 579.
7. Фенько А.А., Репкина Н.С., Таланова В.В. Влияние салициловой кислоты на холодоустойчивость проростков огурца // *Труды Карельского научного центра РАН.* № 1. 2015. С. 26. <https://doi.org/10.17076/eb188>
8. Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea* // *Photosynthetica.* 2003. V. 41. P. 281. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000011962.05991.6c>
9. Zafar Z., Rasheed F., Atif R.M., Javed M.A., Maqsood M., Gailing O. Foliar application of salicylic acid improves water stress tolerance in *Conocarpus erectus* L. and *Populus deltoids* L. saplings: evidence from morphological, physiological, and biochemical changes // *Plants (Basel).* 2021. V. 10. P. 1242. <https://doi.org/10.3390/plants10061242>
10. Kadyrbaev M.K., Golovatskaya I.F., Satkanov M.Zh. Features of regenerants morphogenesis and metabolism *in vitro*, obtained from different fragments of potato shoots // *Tomsk State University Journal of Biology.* 2021. № 55. P. 114. <https://doi.org/10.17223/19988591/55/7>
11. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods Enzymol.* 1978. V. 52. P. 302. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
12. Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. P. 205. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
13. Hewitt E.J., Dickes G.J. Spectrophotometric measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissue // *Biochem J.* 1961. V. 78. P. 384. <https://doi.org/10.1042/bj0780384>
14. 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](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
15. Mancinelli A.L., Hoff A.M., Cottrell M. Anthocyanin production in chl-rich and chl-poor seedlings // *Plant Physiol.* 1988. V. 86. P. 652. <https://doi.org/10.1104/pp.86.3.652>
16. Ломбоева С.С., Танхаева Л.М., Оленников Д.Н. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) // *Химия растительного сырья.* 2008. № 2. С. 65.
17. Зимица Л.Н., Куркин В.А., Рыжов В.М. Исследование флавоноидного состава травы зверобоя пятнистого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Медицинский альманах.* 2012. Т. 2. С. 227.
18. Zagoskina N.V., Dubravina G.A., Alyavina A.K., Goncharuk E.A. Effect of ultraviolet (UV-B) radiation on the formation and localization of phenolic compounds in tea plant callus cultures // *Russ. J. Plant Physiol.* 2003. V. 50. P. 270. <https://doi.org/10.1023/A:1022945819389>
19. Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal Biochem.* 1971. V. 44. P. 276. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)

20. *Shevyakova N.I., Stetsenko L.A., Meshcheryakov A.B., Kuznetsov V.V.* The activity of the peroxidase system in the course of stress-induced CAM development // *Russ. J. Plant Physiol.* 2002. V. 49. P. 598. <https://doi.org/10.1023/A:1020224531599>
21. *Esen A.* A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein // *Anal Biochem.* 1978. V. 89. P. 264. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90749-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90749-2)
22. *Singh R., Singh S., Parihar P., Mishra R.K., Tripathi D.K., Singh V.P., Chauhan D.K., Prasad S.M.* Reactive oxygen species (ROS): beneficial companions of plants' developmental processes // *Front Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 1299. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01299>
23. *Skyba M., Petijová L., Košuth J., Koleva D.P., Ganeva T.G., Kapchina-Toteva V.M., Cellárová E.* Oxidative stress and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. plants subjected to low temperature treatment // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. P. 955. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.02.017>
24. *Eom S.H., Ahn M.A., Kim E., Lee H.J., Lee J.H., Wi S.H., Kim S.K., Lim H.B., Hyun T.K.* Plant response to cold stress: cold stress changes antioxidant metabolism in heading type kimchi cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) // *Antioxidants (Basel)*. 2022. V. 11. P. 700. <https://doi.org/10.3390/antiox11040700>
25. *Ogorodnova U.A., Akhmetov A.M., Shakirova F.M., Timofeeva O.A.* Changes in hormonal status and expression of lectin genes in wheat seedlings treated with stevioside and exposed to low above-zero temperatures // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 259. <https://doi.org/10.1134/S1021443720010136>
26. *Huang H., Ullah F., Zhou D.X., Yi M., Zhao Y.* Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 25. P. 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
27. *Jaspers P., Kangasjärvi J.* Reactive oxygen species in abiotic stress signaling // *Physiol. Plant.* 2010. V. 138. P. 405. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x>
28. *Iqbal N., Fatma M., Gautam H., Sehar Z., Rasheed F., Iqbal M., Khan R., Sofó A., Khan N.A.* Salicylic acid increases photosynthesis of drought grown mustard plants effectively with sufficient-N via regulation of ethylene, abscisic acid, and nitrogen-use efficiency // *J. Plant Growth Regul.* 2022. V. 41. P. 1966. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10565-2>
29. *Khan M.I.R., Fatma M., Per T.S., Anjum N.A., Khan N.A.* Salicylic acid – induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 462. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00462>
30. *Proadhan M.Y., Munemasa S., Nahar M.N.-E.N., Nakamura Y., Murata Y.* Guard cell salicylic acid signaling is integrated into abscisic acid signaling via the Ca²⁺/CPK-dependent pathway // *Plant Physiol.* 2018. V. 178. P. 441. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00321>
31. *Szalai G., Pál M., Janda T.* Abscisic acid may alter the salicylic acid-related abiotic stress response in maize // *Acta Biol. Szeged.* 2011. V. 55. P. 155.
32. *Dugas A.J., Castañeda-Acosta Jr.J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W.* Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure–activity relationships // *J. Nat Prod.* 2000. V. 63. P. 327. <https://doi.org/10.1021/np990352n>
33. *Cai W., Chen Y., Xie L., Zhang H., Hou C.* Characterization and density functional theory study of the antioxidant activity of quercetin and its sugar-containing analogues // *Eur. Food Res. Technol.* 2014. V. 238. P. 121. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2091-x>
34. *Kuznetsov V.V., Shevyakova N.I.* Proline under stress: biological role, metabolism, and regulation // *Russ. J. Plant Physiol.* 1999. V. 46. P. 274.
35. *Naraikina N.V., Pchelkin V.P., Tsydendambaev V.D., Trunova T.I.* Changes in fatty acid composition and lipid content of potato leaves during low temperature hardening: role of $\delta 12$ -acyl-lipid desaturase // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 267. <https://doi.org/10.1134/S1021443720020119>
36. *Butsanets P.A., Shugaeva N.A., Shugaev A.G.* Effect of melatonin and salicylic acid on ROS generation by mitochondria of lupine seedlings // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 745. <https://doi.org/10.1134/S1021443721040038>
37. *Ignatenko A.A., Talanova V.V., Repkina N.S., Titov A.F.* Effect of salicylic acid on antioxidant enzymes and cold tolerance of cucumber plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 491. <https://doi.org/10.1134/S1021443721020059>
38. *Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Bagci E.G., Cicek N.* Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity // *J. Plant Physiol.* 2007. V. 164. P. 728. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.009>
39. *Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P., Murr D.P., Watkins C.B.* Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂) // *Plant Physiol.* 1997. V. 115. P. 137. <https://doi.org/10.1104/pp.115.1.137>
40. *Vicente M. R.-S., Plasencia J.* Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3321. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>
41. *Jia X., Wang L., Zhao H., Zhang Y., Chen Z., Xu L., Yi K.* The origin and evolution of salicylic acid signaling and biosynthesis in plants // *Molecular Plant.* 2023. V. 16. P. 245. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.12.002>
42. *Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A.* Role of proline under changing environments: a review // *Plant Signal Behav.* 2012. V. 7. P. 1456. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>