



ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

Издается с января 1969 г.
(до 2017 г. – под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»)

Выходит три раза в год

2

2018

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор	СИДОРОВ А. В. – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: sidorov@bsu.by
Заместитель главного редактора	ДЕМИДЧИК В. В. – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Ответственный секретарь	ХРАМЦОВА Е. А. – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru

Гельтман Д. В.	Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Давыденко О. Г.	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Зинченко А. И.	Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Кильчевский А. В.	Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А.	Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Медведев С. С.	Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Решетников В. Н.	Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Семак И. В.	Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Титок М. А.	Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А.	Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief	SIDOROV A. V. , doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: sidorov@bsu.by
Deputy editor-in-chief	DEMIDCHIK V. V. , doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Executive secretary	KHRAMTSOVA E. A. , PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru
Geltman D. V.	V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
Davydenko O. G.	Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Zinchenko A. I.	Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kilchevsky A. V.	National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kulchitsky V. A.	Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Medvedev S. S.	Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
Reshetnikov V. N.	Central Botanical Garden, Minsk, Belarus.
Semak I. V.	Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Titok M. A.	Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Usanov S. A.	National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

PLANT CELL BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

К 90-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И БИОИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА БГУ

TO THE 90th ANNIVERSARY OF THE DEPARTMENT OF PLANT CELL BIOLOGY AND BIOENGINEERING OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

История кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений ведет свое начало с 1928 г., когда на биологическом факультете БГУ была организована кафедра физиологии растений и микробиологии. Возглавил ее выдающийся физиолог и биохимик растений, академик АН БССР Тихон Николаевич Годнев. На кафедре, позже переименованной в кафедру физиологии и биохимии растений, осуществлялась не только подготовка кадров высшей квалификации, но и активная научно-исследовательская деятельность. В 1957 г. при кафедре была создана лаборатория фотосинтеза. Основным направлением исследований являлось изучение процессов хлорофиллообразования и установление структуры фотосинтетического аппарата растений в изменяющихся условиях среды. В этой области кафедра в течение многих лет занимала одну из лидирующих позиций не только в СССР, но и в мире.

С 1960 по 1971 г. кафедрой заведовал кандидат биологических наук, доцент С. В. Калишевич, а с 1971 по 1991 г. – кандидат биологических наук, доцент Л. В. Кахнович. Были продолжены исследования, начатые Т. Н. Годневым. Изучались морфогенетические особенности формирования пластидного аппарата растений, влияние экзогенных и эндогенных факторов на формирование фотосинтетического аппарата на различных уровнях организации.

С 1991 по 2011 г. кафедрой заведовал доктор биологических наук, профессор Владимир Михайлович Юрин, являющийся мировым классиком в исследованиях клеточных механизмов ионного транспорта у растений. Начали успешно развиваться новые как фундаментальные, так и прикладные направления, такие как электрофизиология, ксенобиология, экотоксикология и биотехнология растений. В 1997 г. при кафедре создана научно-исследовательская лаборатория физиологии растительной клетки, которая в 2012 г. была переименована в НИЛ физиологии и биотехнологии растений. Профессором В. М. Юриным создана научно-педагогическая школа в области электрофизиологии и ксенобиологии растений.

В настоящее время кафедру возглавляет ученик В. М. Юрина – доктор биологических наук Вадим Викторович Демидчик, один из ведущих в мире специалистов в области оксидативного стресса, ионного

транспорта, механизмов рецепции и сигнализации у растений. С приходом Вадима Викторовича на кафедру стали активно развиваться новые научно-исследовательские направления, такие как молекулярная и клеточная физиология стресса, клеточная сигнализация, нанотоксикология, микроклональное размножение и биоинженерия декоративных растений. По инициативе В. В. Демидчика в 2013 г. кафедра получила современное название – клеточной биологии и биоинженерии растений.

На кафедре ведется научно-исследовательская работа, соответствующая приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь. Сфера научных интересов сотрудников включает разнообразные современные направления исследований. Изучаются механизмы функционирования и регуляции физиологических процессов растений на разных уровнях организации: молекулярном, клеточном, субклеточном, организменном, а также связей растительных организмов с окружающей средой.

Основные научные направления работы кафедры:

- установление механизмов транспорта веществ и рецепции на плазматической мембране растительной клетки, закономерностей регуляции данных процессов эндо- и экзогенными физико-химическими факторами, их участия в физиологических и патофизиологических процессах в организме растения;
- развитие новых биотехнологий на основе культур клеток, тканей и органов растений. Установление физиолого-биохимических механизмов жизнедеятельности культур клеток *in vitro*, контролирующих процессы биосинтеза биологически активных веществ;
- развитие биоинженерных подходов в биотехнологии растений: использование техники иммобилизации, наночастиц, фотобиореакторов, генетической модификации в целях стимуляции и контроля метаболических и ростовых процессов;
- анализ влияния на организм растения неблагоприятных факторов среды и ксенобиотиков (патогенов, засоления, засухи, тяжелых металлов, ионизирующей радиации);
- установление генетических и физиологических механизмов окислительного стресса, запрограммированной клеточной гибели и аутофагии у высших растений. Моделирование воздействия стресс-факторов на урожайность;
- биотестирование загрязнения окружающей среды на основе ответов клеток растений;
- исследование действия новых классов иммуностимуляторов и адаптогенов растений (фитопростагноидов и элиситоров пептидной природы) на устойчивость сельскохозяйственных культур к стрессовым факторам;
- клонирование декоративных растений в условиях *in vitro* в целях их массового размножения в промышленных масштабах;
- феномика высших растений. Разработка платформы для феномного анализа древесных растений;
- разработка и усовершенствование учебно-методических комплексов для преподавания дисциплин, связанных с экспериментальной и прикладной биологией растений, ксенобиологией, системной биологией.

Одним из классических научных направлений, развиваемых на кафедре достаточно давно, но не утративших актуальность в настоящее время, является исследование ионтранспортных систем плазматической мембраны растительной клетки. На кафедре поддерживается и развивается научная школа профессора В. М. Юрина, изучаются механизмы поступления минеральных веществ в растительную клетку на молекулярно-генетическом уровне.

В ходе многолетних исследований В. М. Юрина, А. И. Соколика и В. В. Демидчика установлены механизмы функционирования и закономерности регуляции K^+ -, Ca^{2+} -, Cl^- -каналов и неселективных ионных каналов плазматической мембраны клеток растений. В. В. Демидчиком предложена первая функциональная классификация неселективных катионных каналов (НКК), согласно которой они подразделяются на 7 основных классов: 1) стационарные деполяризационно-активируемые; 2) стационарные гиперполяризационно-активируемые; 3) стационарные потенциалнезависимые; 4) активируемые циклическими нуклеотидами; 5) активируемые аминокислотами; 6) активируемые активными формами кислорода (АФК); 7) активируемые патогенными элиситорами. Показано, что НКК обеспечивают стационарный пассивный транспорт одновалентных и двухвалентных катионов, а также катионные потоки в ответ на генерацию АФК, действие аминокислот и пуринов. Полученные результаты указывают на прямое участие НКК в регуляции минерального обмена, ответе растительной клетки на стрессовые воздействия, росте и развитии растения (рост клетки растяжением), т. е. в процессах, контролирующих урожайность сельскохозяйственных культур и биоразнообразие дикой флоры. Особое значение результаты имеют для развития генно-инженерных подходов в регуляции урожайности и стрессоустойчивости растений.

По проблеме устойчивости растений к биотическим стрессорам изучена модификация ионтранспортных систем плазматической мембраны растительных клеток при атаке грибных патогенов и их связь с синтезом защитных соединений и развитием реакции гиперчувствительности. На корнях проростков пшеницы показано, что при действии гриба *Fusarium* усиливается выход ионов калия. Методом «пэтч-кламп» на протопластах из корней пшеницы установлено, что катионные каналы относительно устойчивого к фузариозу сорта активируются в присутствии культуральной жидкости *Fusarium culmorum*, в то время как катионные каналы у чувствительного сорта не изменяют своих характеристик. Очевидно, способность реагировать на присутствие в среде фитопатогена *Fusarium culmorum* потенциально может лежать в основе устойчивости пшеницы к фузариозам.

Установлено значительное стрессовое воздействие выделений патогенных грибов на ацидофицирующую активность корневой системы проростков пшеницы. В частности, после обработки культуральным фильтратом *Fusarium* наблюдается стимуляция ацидофицирующей активности корней. Препарат «Тубелак» снимает стимуляцию ацидофикации, вызванную грибом, «Туберит» оказывает аналогичное действие, но в меньшей степени, а брассиностероид эпин практически не действует на исследуемый процесс. Полученные закономерности вносят существенный вклад в понимание механизмов действия фитопатогенов на растительные клетки и могут служить основой для разработки новых классов биологически активных препаратов в целях повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к биотическим стрессорам.

Обеспечение длительного и безопасного существования живых организмов в условиях высокого техногенного загрязнения возможно лишь при глубоком изучении механизмов биологического действия химических соединений. С учетом того что первичной мишенью при применении экзогенных соединений является плазматическая мембрана, изучается влияние отдельных классов веществ на ее транспортно-барьерные свойства и функционирование отдельных систем переноса ионов. Выбор соединений определяется хозяйственной направленностью и необходимостью тестирования экологической безопасности. В частности, использование большого количества пестицидов приводит к их попаданию в биосферу, где живые организмы начинают испытывать на себе «пестицидный пресс». Сформировался своеобразный «пестицидный парадокс», смысл которого состоит в том, что человечество, применяя пестициды, само попадает под их воздействие.

Поскольку первичной мишенью для пестицидов является плазматическая мембрана, то представляется целесообразным выявить их влияние на ее транспортные свойства. Установлены особенности действия сим-триазиновых гербицидов (атразин, симазин, прометрин), триазоловых фунгицидов (пропиконазол, тебуконазол, ципроконазол) и цианосодержащих пиретроидных инсектицидов (дельтаметрин, циперметрин, эсфенвалерат) на транспортные характеристики цитоплазматической мембраны клеток растений. Быстрое развитие биоэлектрической реакции растительной клетки на действие испытанных пестицидов свидетельствует об их первичном непосредственном влиянии на плазматическую мембрану. Эта закономерность подтверждается данными о характере потенциалзависимости сдвигов скорости циклоза под действием пестицидов. Триазоловые фунгициды, сим-триазиновые гербициды и цианосодержащие пиретроидные инсектициды характеризуются различной степенью мембранотропной активности, располагаясь в следующие ряды: пропиконазол > тебуконазол > ципроконазол, атразин > симазин > прометрин и эсфенвалерат > дельтаметрин > циперметрин. Анализ приведенных рядов указывает на то, что из гербицидов большей токсичностью для растительной клетки обладают хлорсодержащие сим-триазины (атразин, симазин) по сравнению с тиометилсодержащими (прометрин), среди фунгицидов – дихлорсодержащее соединение (пропиконазол), а для цианосодержащих пиретроидных инсектицидов – эсфенвалерат.

Показано, что взаимодействие молекул испытанных фунгицидов с плазматической мембраной, преимущественно с ее липидной фазой, обусловлено липофильными свойствами заместителей в положении N-1 триазолового кольца. Для испытанных пиретроидных инсектицидов установлена положительная связь между сдвигами электрического потенциала плазматической мембраны и молекулярной рефракцией и поляризуемостью молекул. Выявленные индуцируемые пестицидами молекулярно-мембранные перестройки транспортных систем плазматической мембраны растительных клеток позволили разработать концепцию в области тестирования биологической активности ксенобиотиков и средств экологического мониторинга.

Последние 20 лет на кафедре большое внимание уделяется изучению вторичного метаболизма в клетках культур растений *in vitro*. Получены стабильно растущие каллусные ткани и клеточные суспензии ряда лекарственных растений: эхинацеи пурпурной, шалфея лекарственного, сирени обыкновенной, каллизии душистой, пажитника греческого, катарантуса розового, барвинка малого и др. Представленные виды характеризуются разнообразием фармакологических эффектов и содержат раз-

личающиеся по химической структуре и физико-химическим свойствам группы вторичных метаболитов. Для каждой культуры установлены оптимальные условия культивирования, позволяющие повышать продукцию вторичных метаболитов.

Клетки каллусной культуры *Vinca minor* синтезируют широкий спектр индольных алкалоидов, среди которых по содержанию преобладают дегидровинцин и дегидровинкамаин. В каллусной культуре барвинка малого установлено наличие стриктозидина. Показано, что в каллусных культурах *Vinca minor* и *Catharanthus roseus* стриктозидина накапливается существенно больше, чем в нативных растениях.

Свет стимулирует активность триптофандекарбоксилазы и повышает содержание триптамина в каллусных тканях *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*. Установлено, что под действием света увеличивается содержание дегидровинкамайина и дегидровинцина в клетках каллусной ткани *Vinca minor* и серпентина в каллусных тканях *Catharanthus roseus* вне зависимости от концентрации нафтилуксусной кислоты в среде культивирования. Накопление аймалицина в каллусных клетках *Catharanthus roseus* под влиянием света зависит от концентрации нафтилуксусной кислоты в среде инкубации.

Суспензионные культуры клеток *Echinacea purpurea* и *Echinacea pallida* характеризуются хорошо выраженной способностью к синтезу вторичных метаболитов фенольной природы. Доминирующей группой фенольного комплекса обеих суспензионных культур являются гидроксикоричные кислоты и их производные, тогда как флавоноиды относятся к минорным его компонентам. В целях повышения уровней накопления суммы фенольных соединений, а также отдельных их классов в клетках суспензионных культур представителей рода *Echinacea* может быть рекомендовано использование определенных концентраций салициловой кислоты и метилжасмоната в качестве элиситоров. Показано, что для обеих исследованных суспензионных культур метилжасмонат выступает в роли более эффективного элиситора по сравнению с салициловой кислотой. Для повышения их продукционного потенциала может быть рекомендовано использование метилжасмоната в концентрации 10–5 моль/л при переходе культур в фазу замедления роста, т. е. после завершения основных процессов наработки биомассы. Установлено, что возрастание содержания гидроксикоричных кислот в клеточных культурах *Echinacea purpurea* и *Echinacea pallida* в результате обработки исследованными элиситорами коррелирует с повышением активности L-фенилаланинаммиаклазы.

Впервые получены каллусные культуры листового и стеблевого происхождения пажитника греческого ярового сорта Ovarі 4 и озимого сорта PSZ.G.SZ, установлены их морфологические и физиологические характеристики. Проведен качественный и количественный анализ процесса роста и содержания фенольных соединений каллусов пажитника при действии различных факторов среды (свет, экзогенные углеводы, низкотемпературный и солевой стресс). Изучен антиоксидантный потенциал клеточных культур пажитника греческого. Показана положительная корреляция антирадикальной активности каллусов и общего содержания фенольных соединений. На основе каллусной линии листового происхождения получена суспензионная культура, демонстрирующая высокую продуктивность по биомассе и содержанию фенольных соединений с выраженными антиоксидантными свойствами. Данные результаты существенно дополняют и расширяют имеющиеся представления о процессах регуляции биосинтеза фармакологически активных соединений *in vitro*.

С помощью развиваемых методов (иммобилизация, наночастицы) удалось увеличить эффективность процессов вторичного метаболизма в культурах. Использование иммобилизованных клеток позволило за счет более медленной стационарной фазы роста увеличить наработку биологически активных веществ. Снижение скорости роста клеточной культуры способствует более высокому выходу вторичных метаболитов. Кроме того, иммобилизация клеток в полисахаридных носителях снижает вероятность механического повреждения клеток в ходе культивирования.

Показано, что иммобилизация в кальций-альгинатном геле повышает активность ключевого фермента синтеза индольных алкалоидов триптофандекарбоксилазы в клетках культур *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*. Впервые установлено, что иммобилизация в Ca^{2+} -альгинатном геле клеток суспензионной культуры *Vinca minor* стимулирует синтез и экскрецию винкамина в среду культивирования. Заключение клеток в кальций-альгинат-хитозановый носитель приводит к активации процессов синтеза и экскреции в среду инкубации фенольных соединений, обладающих антирадикальной активностью. При этом инкапсулирование в альгинате натрия низкой вязкости характеризуется наибольшим стимулирующим влиянием на синтез, накопление и экскрецию триптамина клетками *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*.

Установлено, что низкие уровни наночастиц меди (1 мг/л) способны стимулировать прирост биомассы клеток фотомиксотрофной каллусной культуры *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, в то время как макрочастицы меди (балк-частицы) не вызывают подобного эффекта. Начиная с уровня 5 мг/л наночастицы меди

стимулируют накопление антоцианов и рост антиоксидантной активности данных культур. Увеличение концентрации как нано-, так и макрочастиц меди в среде культивирования до 25 и 125 мг/л подавляет рост каллуса *C. roseus*. Результаты работы имеют важное фундаментальное значение, так как указывают на особый токсико-регуляторный характер взаимодействия наночастиц с каллусной тканью и наличие «наноэффекта», отличного от влияния макрочастиц меди.

Одной из важнейших проблем современной биологии является повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды. Современный научно обоснованный подход к стратегии защиты растений исходит из того, что экологически наиболее приемлемы и безопасны методы с использованием природных либо моделирующих их регуляторов физиологических процессов, активирующих собственные защитные системы растительного организма. Вещества, проявляющие элиситорные свойства, применяются в низких концентрациях, они не загрязняют окружающую среду, не обладают биоцидным действием, не токсичны, безопасны для человека и животных. Относительно небольшая стоимость и очень низкие нормы расхода делают их использование экологически и экономически выгодным.

На кафедре проводится исследование биологической активности новых классов элиситоров, таких как простаноиды – производные ненасыщенных жирных кислот и пептидные элиситоры, синтезированные в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. Установлено, что синтетические простаноиды проявляют биологическую активность в концентрациях 10^{-6} – 10^{-7} моль/л, это сравнимо с содержанием данных соединений в растениях. Выявлены простаноиды, оказывающие стимулирующее воздействие на скорость прорастания и всхожесть семян, а также морфометрические характеристики проростков сельскохозяйственных культур. Установленные эффекты обусловлены гиббереллиноподобной активностью данных соединений.

Показано, что некоторые синтетические простаноиды обладают защитным эффектом у растений, подвергающихся действию неблагоприятных факторов среды. Указанные соединения вызывают индукцию антистрессовых механизмов, в результате снижается скорость окислительных процессов при действии стрессовых факторов. Простаноиды способствуют повышению активности антиоксидантных ферментов, что свидетельствует о росте неспецифической устойчивости растений к действию стрессоров.

Синтетические олигопептиды GmPep890, GmPep914, AtPep и SubPep проявляют элиситорное действие в концентрациях 10^{-9} – 10^{-12} моль/л. Экзогенная обработка растений данными соединениями приводит к увеличению содержания растворимых фенольных соединений и показателя антиоксидантной активности в листьях бобовых культур, что связано с индукцией сигнальных систем. Выявлено, что пептидные элиситоры вызывают запуск механизмов антиоксидантной защиты, в результате чего происходит снижение уровня АФК и, как следствие, скорости окислительных процессов в растениях в условиях действия стрессовых факторов. Разработаны композиции на основе пептидных элиситоров GmPep890 и GmPep914 в сочетании с глутаминовой или янтарной кислотами, приводящие к увеличению устойчивости сельскохозяйственных культур к действию оксидативного стресса и гипертермии.

Под руководством В. В. Демидчика исследуется проблема воздействия экзогенного Ca^{2+} на модификацию плазматической мембраны клеток корня при стрессе в целях разработки новых средств повышения стрессоустойчивости высших растений. Установлены изменения в процессах окисления липидов плазматической мембраны, вызываемого гидроксильными радикалами, под действием Ca^{2+} , а также при имитации засоления. Показано, что Ca^{2+} не влияет на окисление фосфатидилхолина, в то время как высокие уровни NaCl затормаживают этот процесс. Анализ изменения липидного состава плазматических мембран при помощи MALDI TOF и LC-MS продемонстрировал, что Ca^{2+} модифицирует ответ липидов на гидроксильные радикалы. В частности, наблюдается уменьшение количества окисленных и лизоформ липидов, а также ослабление окисления фосфатидилсерина.

В связи с неуклонным увеличением техногенного и антропогенного воздействия на живую природу особую актуальность имеют работы по экофизиологии. Простое феноменологическое описание взаимоотношений между различными живыми системами и окружающей средой не позволяет в полной мере ни оценить существующей угрозы, ни прогнозировать последствий этого воздействия. С каждым годом все более очевидна необходимость вскрытия и описания закономерностей этих взаимоотношений на уровне физиолого-биохимических и молекулярных механизмов, происходящих в живых системах, в частности в растительных организмах. На кафедре ведутся научно-исследовательские работы, направленные на решение ряда экофизиологических проблем. Среди них – изучение токсичности сточных и природных вод с помощью отдельных клеток водорослей *Nitella flexilis*. Сотрудниками кафедры создано устройство «Биотест», позволяющее проводить непрерывный экспрессный мониторинг качества окружающей среды на основе электроальгологического метода.

Еще одним важным направлением является исследование механизмов поступления и накопления в сельскохозяйственных культурах радионуклидов и тяжелых металлов. Эта задача решается путем выявления закономерностей накопления в растениях тяжелых металлов и радионуклидов при внесении биоугля в почву. Изучено влияние добавки биоугля к суглинистой почве на параметры накопления кадмия (Cd) и свинца (Pb) в растениях пшеницы. Установлено, что внесение биоугля увеличивает биомассу надземной части растений и корней, а также на 20–30 % снижает накопление Cd в корнях и надземной части, но не влияет на аналогичные показатели для Pb. По-видимому, эффект биоугля вызван не просто адсорбцией ионов тяжелых металлов.

Параметры накопления ^{109}Cd в корнях пшеницы существенно превышают таковые для ^{90}Sr , несмотря на химическое сходство ионов. Ингибиторный анализ с применением блокаторов катионных каналов Gd^{3+} и верапамила показал существенно большее возрастание и ускорение накопления ^{109}Cd по сравнению с ^{90}Sr при аппликации Gd^{3+} . Можно предположить, что ^{109}Cd и ^{90}Sr входят в корень различными механизмами, причем для ^{109}Cd доля катионных каналов существенно меньше, чем для ^{90}Sr .

В результате проведенных исследований установлено, что биоуголь при внесении в почву проявляет мелиоративное действие, увеличивая биомассу растений, снижая накопление тяжелых металлов, в частности Cd. Особенно сильно этот эффект выражен для почв с невысокой обменной емкостью (супесь) и практически отсутствует для почв с высоким содержанием органического вещества (торфяные). Для Pb и Sr при оптимальной влажности почвы мелиоративное действие биоугля невелико и возрастает при снижении влагосодержания. Практический вывод состоит в том, что внесение биоугля в почву в объеме до 5 % вызывает либо мелиоративное действие, либо по меньшей мере растениям не вредит.

Прикладные работы ведутся по вопросам разработки и оптимизации методов клонирования декоративных растений *in vitro* в целях их массового размножения в промышленных масштабах. Совместно с УП БГУ «Щемяслица» создан Научно-практический центр по микроклональному размножению декоративных растений. В рамках работы данного центра получены коллекции клонов ряда декоративных комнатных растений (более 100 видов и гибридов орхидей), кустарников (барбарис Тунберга, боярышник колючий, кизильник блестящий, форзиция средняя), древесных декоративно-лиственных и хвойных растений (клен остролистный, можжевельник скальный, туя западная, ель обыкновенная, ель колючая).

С использованием новых классов регуляторов роста разрабатываются методы ускоренного вегетативного размножения растений в условиях озеленительного хозяйства. Установлено, что жизнеспособность и укореняемость эксплантов ели колючей возрастают при обработке ауксинами в сочетании с диспергированными в водной среде наночастицами серебра, оксида титана и оксида железа. Значительное стимулирующее воздействие также оказывает обработка антиоксидантами и брассиностероидами. Среди протестированных веществ – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, индолил-3-уксусная кислота, 3-индолилмасляная кислота, 1-нафталинуксусная кислота, эпибрассинолид и наночастицы серебра обладали наиболее значительной корнестимулирующей активностью. На основе полученных данных созданы протоколы, лабораторные регламенты и методические указания.

Одно из важнейших направлений кафедры – разработка новых методик преподавания физиологии и биохимии растений, системной биологии, клеточной биологии и биотехнологии. В рамках данного направления сотрудники кафедры ведут активную работу по обновлению читаемых курсов, соответствующих современным мировым тенденциям развития биологической науки, а также внедрению новых дисциплин, созданию учебно-методических комплексов, написанию учебно-методических пособий.

За последние 5 лет были разработаны и внедрены в учебный процесс следующие дисциплины: «Клеточная биология» (доктор биологических наук В. В. Демидчик), «Введение в системную биологию» (кандидат биологических наук, доцент А. И. Соколик), «Культуры эукариотических клеток» (кандидат биологических наук, доцент Т. И. Дитченко), «Активные формы кислорода в жизни растений» (доктор биологических наук В. В. Демидчик), «Устойчивые агротехнологии и фитодизайн» (кандидат биологических наук, доцент О. Г. Яковец).

Издан ряд учебных и учебно-методических пособий:

1. Филицкова Г. Г., Молчан О. В. Фотосинтез : учеб. пособие. Минск : БГУ, 2017. 196 с. (с грифом УМО).
2. Филицкова Г. Г. Фотосинтез : метод. рекомендации к лаб. занятиям, задания для самостоят. работы и контроля знаний студентов биол. фак. Минск : БГУ, 2017. 40 с.
3. Юрин В. М. Ксенобиология : учебник. Минск : БГУ, 2015. 247 с. (с грифом МО Республики Беларусь).
4. Юрин В. М., Яковец О. Г., Дитченко Т. И. Ксеноэкология [Электронный ресурс] : пособие. Минск : БГУ, 2015. 218 с. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM) (с грифом УМО).

5. Юрин В. М., Кудряшов А. П., Филицова Г. Г. и др. Ксенобиология : метод. рекомендации к лаб. занятиям для студентов биол. фак. Минск : БГУ, 2015. 29 с.

6. Юрин В. М., Демидчик В. В., Филицова Г. Г. и др. Минеральное питание, физиология стресса и адаптации растений : метод. рекомендации к лаб. занятиям по курсу «Физиология растений» для студентов биол. фак. Минск : БГУ, 2014. 103 с. (с грифом УМО).

7. Юрин В. М. Биомедиаторы в растениях : учеб. пособие. Минск : БГУ, 2013. 199 с. (с грифом МО Республики Беларусь).

Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений имеет прочные научные связи с Центральным ботаническим садом НАН Беларуси, Институтом биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Институтом экспериментальной ботаники НАН Беларуси. Для более тесного сотрудничества и повышения эффективности научно-исследовательской и преподавательской деятельности в 2013 г. основан филиал кафедры в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси.

Кафедра активно сотрудничает с ведущими зарубежными научными центрами, участвует в выполнении крупных международных проектов.

В проекте Евросоюза FP7 IRSES «Plant DNA tolerance» партнерами кафедры являются научные учреждения Великобритании, Германии, Словакии, Чехии, Украины и России. К настоящему времени в рамках этого проекта установлены закономерности воздействия важнейших стресс-факторов на растения арабидопсиса и пшеницы на фоне различных доз гамма-облучения.

Кроме этого, выполняются работы по гранту Российского научного фонда для ведущих иностранных ученых «Стресс и автофагия у растений: регуляторная роль цитоплазматического калия и активных форм кислорода». Проведены измерения кривых выхода ионов радиоактивного изотопа ^{86}Rb из корней растений арабидопсиса, отличающихся экспрессией и функциональной активностью калиевых каналов.

Результаты научно-исследовательской работы сотрудников кафедры отражены в ряде зарубежных статей с высоким импакт-фактором:

1. Makavitskaya M., Svistunenko D., Navaselsky I., et al. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca^{2+} signals and efflux from cells via anion channels // J. Exp. Bot. 2018. DOI: 10.1093/jxb/ery056.

2. Demidchik V., Maathuis F., Voitsekhovskaja O. Unravelling the plant signalling machinery: an update on the cellular and genetic basis of plant signal transduction // Funct. Plant Biol. 2018. Vol. 45. P. 1–8.

3. Demidchik V., Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS- Ca^{2+} Hub» // Funct. Plant Biol. 2018. Vol. 45. P. 9–27.

4. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of *Arabidopsis thaliana* plants // Plant J. 2016. Vol. 85. P. 245–257.

5. Malachowska-Ugarte M., Sperduto C., Ermolovich Y. V., et al. Brassinosteroid-BODIPY conjugates: Design, synthesis, and properties // Steroids. 2015. Vol. 102. P. 53–59.

6. Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., et al. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants // Steroids. 2015. Vol. 97. P. 98–106.

7. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology // Environ. Exp. Bot. 2015. Vol. 109. P. 212–228.

8. Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S. S., et al. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^{+} -permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment // J. Exp. Bot. 2014. Vol. 65. P. 1259–1270.

9. Demidchik V. Mechanisms and physiological roles of K^{+} efflux from root cells // J. Plant Physiol. 2014. Vol. 171. P. 696–707.

В последние годы изданы следующие монографии:

1. Demidchik V. Reactive oxygen species and their role in plant oxidative stress / ed. S. Shabala // Plant Stress Physiology. Wallingford : CAB International, 2016 (in press).

2. Юрин В. М. Иммобилизованные клетки лекарственных растений. Саарбрюккен : LAP Lambert Acad. Publ., 2014. 130 с.

3. Демидчик В. В. Неселективные катионные каналы плазматической мембраны клеток корня высших растений. Минск : БГУ, 2014. 225 с.

Таким образом, на кафедре клеточной биологии и биоинженерии растений создана необходимая материальная база и есть достаточный интеллектуальный потенциал для развития целого ряда современных научных направлений, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение.

Планируется, что дальнейшие научные исследования на кафедре будут связаны в первую очередь с установлением молекулярно-клеточных основ стрессоустойчивости и продуктивности растений,

созданием новых эффективных биотехнологий и систем анализа на основе культур клеток растений, а также с разработкой и оптимизацией современных методов микроклонального размножения декоративных растений.

Одной из первоочередных задач является раскрытие первичных механизмов рецепции и усиления стрессовых и гормонально-регуляторных сигналов на плазматической мембране растительной клетки в связи с их функцией в запуске иммунных реакций, стресс-адаптации и кодировании программ развития растительного организма. Будут определены генетические и клеточные детерминанты регуляции интенсивности потоков макро- и микроэлементов минерального питания растений в целях контроля и программирования урожайности важных для сельского хозяйства Беларуси культурных растений.

*Г. Г. Филиппова¹, В. М. Юрин²,
А. И. Соколик³, В. В. Демидчик⁴*

¹*Галина Григорьевна Филиппова* – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета.

Halina G. Filiptsova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University.

filiptsova@bsu.by

²*Владимир Михайлович Юрин* – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета.

Vladimir M. Yurin, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University.

yurin@bsu.by

³*Анатолий Иосифович Соколик* – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета.

Anatoliy I. Sokolik, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University.

sokolik@bsu.by

⁴*Вадим Викторович Демидчик* – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета.

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University.

demidchik@bsu.by

Ca²⁺-ПРОНИЦАЕМЫЕ КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

**В. С. МАЦКЕВИЧ¹⁾, В. В. САМОХИНА¹⁾, П. В. ГРИУСЕВИЧ¹⁾,
М. А. ВОЙТЕХОВИЧ¹⁾, А. И. СОКОЛИК¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК^{1), 2)}**

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН,
ул. Профессора Попова, 2, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия

Кальций (Ca²⁺) является важным структурным элементом, регулятором метаболических процессов, а также универсальным для живых систем сигнальным агентом-посредником, обеспечивающим взаимосвязь между мембранными рецепторами и генетической экспрессией. Важнейшим феноменом, определяющим сигнально-регуляторную функцию Ca²⁺, выступает его транспорт через плазматическую мембрану и эндомембраны клетки. Ключевую роль в процессах транспорта Ca²⁺ играют катионные каналы, локализованные во всех мембранах растительной клетки. Биоинформационный анализ катионпроницаемых ионных каналов растений не обнаружил в них наличия Ca²⁺-селективных фильтров, схожих с аналогичными системами у животных. Тем не менее мембраны растений обнаруживают Ca²⁺-проводимости, т. е. обладают проницаемостью к Ca²⁺. Биофизические характеристики Ca²⁺-проводимостей растений детально изучены и в последнее время дополнены молекулярно-генетическим анализом. Продемонстрировано, что Ca²⁺-проводимость растений опосредуется несколькими типами неселективных катионных каналов, кодируемых соответствующими семействами генов, в частности каналами, активируемыми циклическими нуклеотидами, ионотропными глутаматными рецепторами, двупоровым каналом 1, аннексинами и несколькими семействами механочувствительных ионных каналов. Накоплен широкий пласт результатов, указывающих на то, что восприятие внешних факторов среды (температура, гравитация, механическое и химическое воздействие), гормональная сигнализация и везикулярный транспорт связаны с активностью отдельных субъединиц данных ионных каналов.

Ключевые слова: кальций; катионные каналы; Ca²⁺-проводимость; каналы, активируемые циклическими нуклеотидами; ионотропные глутаматные рецепторы; механочувствительные каналы; высшие растения.

Образец цитирования:

Мацкевич ВС, Самохина ВВ, Гриусевич ПВ, Войтехович МА, Соколик АИ, Демидчик ВВ. Ca²⁺-проницаемые катионные каналы плазматической мембраны клеток высших растений. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;2:11–26.

For citation:

Mackievic VS, Samokhina VV, Hryvusevich PV, Vaitsiakhovich MA, Sokolik AI, Demidchik VV. Ca²⁺-permeable cation channels of the plasma membrane of higher plant cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:11–26 (in Russ.).

Авторы:

Вера Сергеевна Мацкевич – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Вероника Валерьевна Самохина – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

Полина Вацлавовна Гриусевич – магистрант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Мария Аркадьевна Войтехович – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии и биотехнологии растений, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений, заместитель декана по научно-исследовательской работе биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета¹⁾; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и экологической физиологии²⁾.

Authors:

Viera S. Mackievic, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. v.mackievic@gmail.com

Veranika V. Samokhina, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. veronika.bukhovets@gmail.com

Palina V. Hryvusevich, master's degree student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. polinachikun@gmail.com

Maryia A. Vaitsiakhovich, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. makovitskayama@gmail.com

Anatoly I. Sokolik, PhD (biology); head of the research laboratory of plant physiology and biotechnology, associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, deputy dean for research and development, faculty of biology. sokolik@bsu.by

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology^a; leading researcher at the laboratory of molecular and ecological physiology^b. dzemidchik@bsu.by

Ca²⁺-PERMEABLE CATION CHANNELS OF THE PLASMA MEMBRANE OF HIGHER PLANT CELLS

V. S. MACKIEVIC^a, V. V. SAMOKHINA^a, P. V. HRYVUSEVICH^a,
M. A. VAITSIAKHOVICH^a, A. I. SOKOLIK^a, V. V. DEMIDCHIK^{a, b}

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bKomarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences,
2 Professora Popova Street, St. Petersburg 197376, Russia

Corresponding author: V. S. Mackievic (v.mackievic@gmail.com)

Calcium (Ca²⁺) is an important structural element, regulator of metabolic processes and ubiquitous for all living systems signaling agent that provides a link between membrane receptors and gene expression. The most significant phenomenon determining the signal-regulatory function of Ca²⁺ is its transport through the plasma membrane and the endomembranes of the cell. A key role in this processes is played by cation channels localized in all membranes of the plant cell. Bioinformatics analysis of plant cation channels has not revealed the presence of Ca²⁺-selective filters similar to the systems found in animals. However, plant membranes show pronounced Ca²⁺-mediated currents, i. e. exhibit high permeability to Ca²⁺. Biophysical characteristics of plant Ca²⁺ conductances has recently been studied in details and supplemented by molecular analysis. Ca²⁺ conductance in plant cell membranes is mediated by different cation channels encoded by several families of ion channel genes, such as «cyclic nucleotide-gated channels» (CNGCs), «ionotropic glutamate receptors» (GLRs), «two-pore channel 1» (TPC1), «annexins» and «mechanosensitive-like channels» and some others. Recent studies also suggest that perception of external environmental factors, such as salinity, temperature, pH, gravity, mechanical stimulation, chemical agents, phytohormones and others is associated with the activity of specific subunits of these ion channels.

Key words: calcium; cation channels; Ca²⁺ conductance; cyclic nucleotide-gated channels; ionotropic glutamate receptors; mechanosensitive channels; higher plants.

Условные обозначения и сокращения

[Ca²⁺]_{цит} – цитоплазматическая активность Ca²⁺;
CaMBS – calmodulin binding site (кальмодулинсвязывающий сайт);
CDF – Ca²⁺-dependent facilitation (Ca²⁺-зависимое усиление);
CDI – Ca²⁺-dependent inactivation (Ca²⁺-зависимая инактивация);
CNBD – cyclic nucleotide-binding domain (домен, связывающий циклические нуклеотиды);
CNGC – cyclic nucleotide-gated channels (каналы, активируемые циклическими нуклеотидами);
GLR – «glutamate receptor-like», ionotropic glutamate receptors (ионотропные глутаматные рецепторы);
HEK293 – Human Embryonic Kidney 293 (клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека);
MCA – Midl-complementing activity mechanosensitive channels (механочувствительный канал MCA);
MSL – MscS-like mechanosensitive channels (механочувствительный канал MSL);
OSCA1 – hyperosmolality-induced [Ca²⁺]_{цит} channel 1 (Ca²⁺-канал, индуцирующийся гиперосмолярностью);
TPC1 – two-pore channel 1 (двупоровый канал 1);
TRP – transient receptor potential channels (суперсемейство неспецифических катионных каналов);
АФК – активная форма кислорода;
ВАХ – вольт-амперная характеристика;
ГАКК – гиперполяризационно-активируемый Ca²⁺-канал;
ГАКП – гиперполяризационно-активируемая Ca²⁺-проводимость;
ДАКК – деполяризационно-активируемый Ca²⁺-канал;
ДАКП – деполяризационно-активируемая Ca²⁺-проводимость;
ДСЦН – домен связывания циклических нуклеотидов;
ИГлуР – ионотропный глутаматный рецептор;
КАЦН – канал, активируемый циклическими нуклеотидами;
НАДФН-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаза;
НКК – неселективный катионный канал;
ПНКК – потенциалнезависимый Ca²⁺-канал;
ПНКП – потенциалнезависимая Ca²⁺-проводимость;
цАДФ-рибоза – циклическая аденозиндифосфатрибоза;
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат;
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат.

Введение

Кальций является макроэлементом, присутствующим в растениях в ионной форме (Ca^{2+}) или в комплексе с лигандами, необходимым на всех стадиях онтогенеза растительного организма [1]. Его содержание в тканях растений на сухую массу достигает 1–5 % [1]. В широком физиологическом смысле поступление Ca^{2+} в растение необходимо для поддержания структурных и метаболических потребностей либо для «быстрых регуляторных реакций», т. е. обеспечения нужд клеточной сигнализации, ионного и электрического баланса, перестройки цитоскелета. Стационарный внутрьнаправленный поток Ca^{2+} для поддержания структурных и метаболических функций реализуется в результате работы так называемых конститутивных Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов [2]. Данные системы активны вне зависимости от эндо- и экзогенных модуляторов. Для обеспечения процессов клеточной сигнализации центральным транспортным механизмом является вход Ca^{2+} в цитоплазму через индуцибельные ионные каналы. Быстрая активация и деактивация этих каналов под действием широкого спектра химических агентов и физических факторов приводит к волнообразному повышению $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, т. е. формированию Ca^{2+} -сигнала. Индуцибельные Ca^{2+} -проницаемые ионные каналы у растений изучены недостаточно, в то же время данная группа обильна по количеству генов, а ее представители экспрессируются во всех известных типах клеток и тканей растений.

Кальциевые сигналы служат для кодирования внешних и внутренних стимулов, силы и продолжительности их воздействия, преобразуя информацию о стимулах в физиологический и генетический ответы [3–7]. В последнее время появились обзоры, посвященные анализу функций Ca^{2+} как вторичного посредника при передаче сигналов в растительных клетках, также имеется ряд биоинформационных исследований катионных каналов растений [3–7]. Однако, несмотря на потенциально высокую значимость, систематические исследования Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов и их роли в жизни растения крайне редки. Практически отсутствует информация о генетической основе Ca^{2+} -проводимостей, ответственных за конкретные Ca^{2+} -зависимые функции, такие как стрессовые ответы или растяжение клеток. В связи с этим представляется актуальным провести анализ существующих литературных данных по проблеме Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов растений, их установленным физиологическим функциям и молекулярно-генетической природе. Представленный обзор сфокусирован на анализе современных данных о Ca^{2+} -проницаемых ионных каналах плазматической мембраны клеток высших растений и соотнесении результатов электрофизиологических изысканий с генетической и структурной информацией.

Характеристика Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов растений

В отличие от генов животных геном растений не содержит последовательностей Ca^{2+} -селективных фильтров в ионных каналах [8]. Тем не менее электрофизиологические эксперименты показали, что мембраны растений проницаемы для Ca^{2+} и проводят Ca^{2+} -токи [9]. Таким образом, несмотря на то что растения не имеют классических Ca^{2+} -каналов, они все же обладают Ca^{2+} -проводимостью, которая должна быть опосредована другими типами катионных каналов. Такие каналы называются Ca^{2+} -проницаемыми катионными каналами и характерны не только для растений, но и для животных. У последних примерами являются ионотропные пуринорецепторы, глутаматные рецепторы, а также каналы суперсемейства TRP. Подобно Ca^{2+} -проницаемым каналам животных, все клетки растений обладают Ca^{2+} -проводимостью, которая в соответствии с различными физиологическими нуждами клеток демонстрирует различную активность, а также сложные механизмы эндо- и экзогенной регуляции. Несмотря на то что Ca^{2+} -проводимость растений хорошо изучена на физиологическом уровне, ее связь с продуктами генов по-прежнему практически отсутствует.

Эволюционный анализ семейств Ca^{2+} -проницаемых каналов растений показывает значительное расхождение между высшими растениями и животными [7]. В отличие от животных и водорослей высшие растения утратили 4-доменные потенциалзависимые катионные каналы, инозитол-3-фосфат-связанные рецепторы, P2X-рецепторы, лигандзависимые ионные каналы с цистеиновой петлей и каналы суперсемейства TRP. Тем не менее Ca^{2+} -проницаемые каналы растений, такие как КАЦН, ИГлуР и OSCA1, демонстрируют большее разнообразие филогенетических ветвей, селективных фильтров и возможных регуляторных структур, чем их аналоги у животных [6].

Регистрировать токи через одиночные каналы сложно, поэтому большинство электрофизиологических экспериментов направлены на вычисление суммарного тока всех каналов клетки [10]. Обычно приводятся данные по определению Ca^{2+} -проводимости мембраны, которая представляет собой активность всех действующих каналов для переноса Ca^{2+} и транспортеров в данное время в определенной клетке. Измеренный ток является результатом динамичной и постоянно меняющейся сборки различных субъединиц каналов, он также включает ток активных транспортеров. Эти транспортеры имеют сложный

и тканеспецифический паттерн экспрессии и посттрансляционной модификации. Несколько генов, кодирующих субъединицы канала, могут быть потенциально ответственными за один тип Ca^{2+} -проводимости, вследствие чего различные типы Ca^{2+} -проводимости могут регистрироваться одновременно [11; 12]. Недавно было показано, что в плазматической мембране одной растительной клетки может экспрессироваться и функционировать до 8 различных субъединиц Ca^{2+} -проницаемых каналов [13].

Генетические подходы направлены на изменение экспрессии белка канала: если ген теряет свою функцию при помощи Т-ДНК-вставки или ретротранспозона, системы РНК-интерференции или редактирования генома (нуклеазы TALEN или CRISPR-Cas 9), то проводимость может быть утеряна [6]. Однако наличие большого количества субъединиц Ca^{2+} -проницаемых каналов, таких как КАЦН и ИГлуР, снижает эффективность указанных подходов. Для решения данной проблемы применяются нокауты на основе РНКи (условно инактивируемые нокауты) или генетическая сверхэкспрессия. Другим подходом является изучение субъединиц растительных ионных каналов с использованием техники гетерологической экспрессии в клетках животных, таких как клетки НЕК293 и ооциты *Xenopus*, с последующим анализом токов при помощи методики пэтч-кламп или двухэлектродной фиксации потенциала (two-electrode voltage clamp) соответственно. Неразрешимое ограничение данных подходов заключается в непредсказуемой модификации естественного для растительной клетки фолдинга каналов при их экспрессии в клетках животных. Поэтому результаты исследований экспрессии субъединиц Ca^{2+} -проницаемых каналов растений с использованием клеток животных являются важными с биофизической точки зрения, но не могут быть взяты за основу при построении физиологических моделей и концепций. Кроме того, такие результаты могут быть противоречивы. Например, обнаружено [14], что ИГлуР AtGLR 1.4 при экспрессии в ооцитах *Xenopus* не активируется глутаматом или глицином, однако стимулируется аминокислотами, такими как метионин, триптофан, фенилаланин, лейцин, тирозин и аспарагин, несмотря на то, что эти аминокислоты не вызывают повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в интактных растениях [14–16].

Биофизические свойства Ca^{2+} -проводимости, измеренной *in vivo*

Начиная с 1980-х гг. электрофизиологические методы использовались для регистрации и анализа Ca^{2+} -проводимости в различных растительных образцах [9]. Это позволило определить ключевые биофизические характеристики Ca^{2+} -проводимостей и послужило основой для их классификации, а также дальнейших молекулярных исследований. Основными критериями для электрофизиологической классификации Ca^{2+} -проводимостей являются их локализация, зависимость от напряжения на мембране, кинетика активации, фармакологический профиль, взаимодействие с лигандами и селективность [2; 4–6; 8; 9]. Для построения полной картины функционирования канала все эти характеристики должны быть связаны с генетикой, особенностями устройства (трехмерной структурой) и физиологией.

В зависимости от типа мембраны выделяют Ca^{2+} -проводимости плазматической мембраны и эндо-мембран (тонопласта, мембран хлоропластов, митохондрий и эндоплазматического ретикула). За исключением тонопласта, Ca^{2+} -проводимости эндо-мембран изучены недостаточно. Крайне мало измерений было проведено в условиях *in vivo* [17]. На основе чувствительности к напряжению Ca^{2+} -проводимости растений обычно подразделяются на ДАКП, ГАКП и ПНКП. В некоторых случаях эти проводимости называются каналами (соответственно ДАКК, ГАКК, ПНКК). Биофизические свойства указанных проводимостей рассмотрены в ряде обзоров [2; 4; 5]. Теоретически все Ca^{2+} -проводимости должны кодироваться определенными генами. Подробное описание структуры соответствующих белковых продуктов дано в недавних обзорах [4; 6]. Среди проводимостей, измеренных *in vivo*, ДАКП пока не имеют четко установленной генетической природы.

По кинетике активации Ca^{2+} -проводимости формируют следующие группы: 1) мгновенноактивирующиеся (активирующиеся в течение нескольких миллисекунд); 2) медленноактивирующиеся (активирующиеся в течение нескольких секунд); 3) спайкообразные, проявляющиеся как единичные резкие и кратковременные колебания проводимости в форме спайка в конфигурации *целая клетка*. Быстроактивирующиеся каналы могут быть достаточно долго открыты, хотя этот факт еще полностью не доказан [10; 18]. Проводимости 3-й группы активируются под действием глутамата, наночастиц, АФК или патогенных элиситоров [16; 19].

Лантаниды (Gd^{3+} , La^{3+}), дигидропиридины и фенилалкиламины, хинин, мибефрадил, бепридил или флунаризин (10^{-6} – 10^{-3} моль/л) являются наиболее широко используемыми блокаторами Ca^{2+} -проводимости растений [9; 10]. К сожалению, скрининг и синтез фармакологических агентов, которые бы специфически связывались и блокировали различные классы Ca^{2+} -проницаемых каналов растений, не были проведены. В физиологии животных эта область исследований развита лучше в связи с прямым применением в фармации и медицине [20].

Некоторые Ca^{2+} -проводимости считаются «конститутивными», т. е. они не нуждаются в каких-либо конкретных активаторах (кроме изменения напряжения). В отличие от них лигандактивируемые Ca^{2+} -проводимости активируются только после связывания лиганда со специфическим лигандсвязывающим центром. Несколько внеклеточных лигандов активируют Ca^{2+} -проводимости растений, включая аминокислоты (глутамат, глицин), АФК (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$), пурины (АТФ и АДФ). Также имеется группа внутриклеточных лигандов: цАМФ, цГМФ, цАДФ-рибоза, фосфат, фосфорилированные сахара, производные липидов и H_2O_2 . Они воздействуют на внутриклеточные ионные каналы или на цитоплазматические части каналов плазматической мембраны. Некоторые вещества, такие как полиамины, H^+ , цитоплазматический Ca^{2+} и АФК, могут оказывать модулирующее действие, вызывая ингибирующие или стимулирующие эффекты в зависимости от обстоятельств, концентрации и способа применения. Например, полиамины стимулируют АФК-индуцированную Ca^{2+} -проводимость [21], при этом они выступают блокаторами конститутивных Ca^{2+} -проводимостей [22].

Важным случаем лигандзависимой Ca^{2+} -проводимости являются АФК-активируемые Ca^{2+} -проводимости, участвующие в широком разнообразии физиологических процессов (рост, развитие, гравитропическая реакция, ответ на стресс и др.). Исследования АФК-активируемых катионных каналов животных с использованием молекулярных подходов показали, что эти каналы напрямую и в большинстве случаев обратимо активируются как экзогенными, так и эндогенными АФК [23]. Растения имеют очень схожую активацию, когда АФК действуют по обе стороны плазматической мембраны [24], однако молекулярные механизмы этой активации пока не ясны.

Согласно [25] активирующиеся при гиперполяризации Ca^{2+} -каналы корневых волосков обладают высокой селективностью к Ca^{2+} . Однако в своем большинстве Ca^{2+} -проводимости растений характеризуются значительной проницаемостью как к одно-, так и к двухвалентным катионам, включая K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Rb^+ , Ba^{2+} и Sr^{2+} , и обычно являются слабо проницаемыми для Zn^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} [2]. Таким образом, Ca^{2+} -проводимости растений в основном опосредованы НКК.

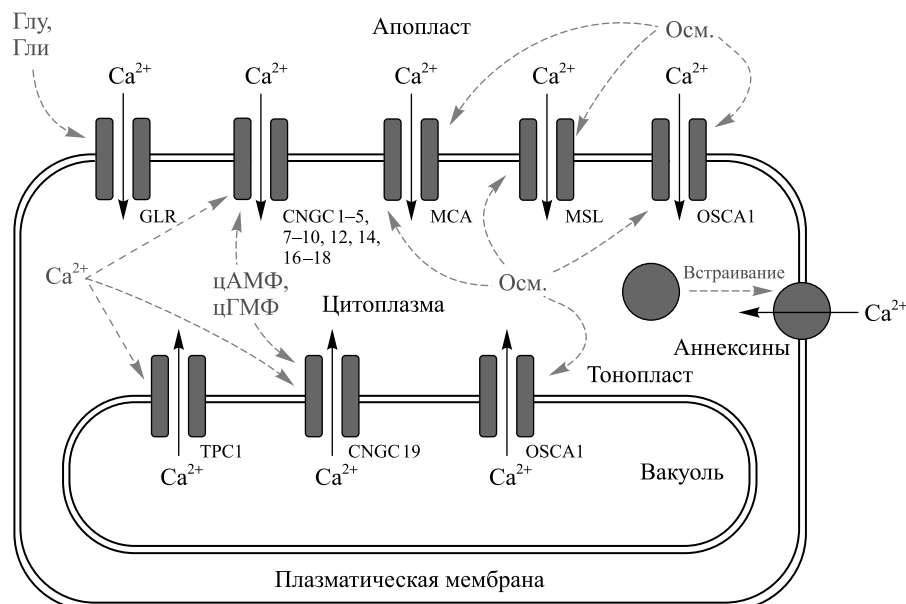
Молекулярные и физиологические свойства клонированных субъединиц Ca^{2+} -проницаемых каналов

Биоинформационный анализ выявил гены предполагаемых Ca^{2+} -проницаемых каналов растений [8; 9]. Наилучшим образом изучены гены, кодирующие отдельные субъединицы ионных каналов *Arabidopsis thaliana*. Их трансмембранная топология представлена на рисунке. С помощью подходов гетерологической экспрессии и электрофизиологических приемов в условиях *in vivo* показано, что некоторые из этих генов действительно кодируют Ca^{2+} -проницаемые катионные каналы мембран растительной клетки.

Катионные каналы растений можно разделить на K^+ -селективные каналы и НКК [9]. K^+ -каналы содержат селективный для K^+ мотив ТХGYGD/Е в области поры (или только GYG-мотив: Gly-Tyr-Gly), в то время как НКК обнаруживают уникальные селективные фильтры, отсутствующие у животных и других групп живых организмов. НКК по количеству генов значительно превосходят K^+ -каналы [4; 9; 26]. Недавно было показано, что голосеменные, мхи и водоросли (но не покрытосеменные растения) содержат несколько генов белков семейства ORAI [7]. Эта группа еще не изучена, поэтому далее обсуждаться не будет. Однако данный факт указывает на качественную разницу в семействах катионных каналов различных групп растений. КАЦН структурно схожи с членами классического суперсемейства Shaker, обладающего 6 трансмембранными доменами [27; 28].

Каналы, активирующиеся циклическими нуклеотидами

КАЦН растений формируют 6 филогенетических ветвей и показывают значительное расхождение со своими аналогами у животных. Каждая субъединица канала содержит ДСЦН на С-конце, имеющий стандартную структуру бета-сэндвича, в которой нуклеотид связывается внутри кармана между бета-листами. КАЦН растений открываются после связывания цГМФ и цАМФ, хотя подтверждение этого механизма активации пока отсутствует в экспериментах *in vivo*. Указанные каналы присутствуют в плазматической мембране, за исключением CNGC 19. Они экспрессируются в эпидермисе корней и листьев, где участвуют в восприятии и преобразовании сигналов окружающей среды. КАЦН замыкающих клеток устьиц и клеток мезофилла принимают участие в закрывании устьиц и регуляции фотосинтеза [26; 29]. КАЦН ответственны за Ca^{2+} -осцилляции в ядре в симбиотическом сигнальном пути в корнях бобовых; они запускают выход Ca^{2+} из его депо в эндоплазматическом ретикулуле [30]. Структурное моделирование, основанное на кристаллографии ионных каналов животных и бактерий, показало, что селективные фильтры КАЦН растений содержат уникальные аминокислотные триплеты: 1) GQN (AtCNGC 1, 3, 10–15, 17 и 18); 2) GQG (AtCNGC 5–9); 3) AGN (AtCNGC 19 и 20); 4) GQS (AtCNGC 16); 5) AND (AtCNGC 2); 6) GN-L (AtCNGC 4) [26].



Трансmemбранная топология и регуляция основных групп Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов:
CNGC – каналы, активируемые циклическими нуклеотидами; GLR – ионотропные глутаматные рецепторы;
MCA – механочувствительный канал MCA; MSL – механочувствительный канал MSL; TPC1 – двупоровый канал 1;
OSCA1 – Ca^{2+} -канал, индуцирующийся гиперосмоллярностью; Гли – глицин; Глу – глутамат;
Осм. – изменение осмолальности раствора/среды; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат;
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

Transmembrane topology and regulation of the main groups of Ca^{2+} -permeable ion channels:
cAMP – cyclic adenosine monophosphate; cGMP – cyclic guanosine monophosphate;
CNGC – cyclic nucleotide-gated ion channels; GLR – ionotropic glutamate receptors;
Glu – glutamate; Gly – glycine; MCA – Mid1-complementing activity mechanosensitive channels;
MSL – MscS-like mechanosensitive channels; TPC1 – two-pore channel 1;
OSCA1 – hyperosmolality-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ channel 1; Osm. – changes in osmolality of solution/medium

Роль триплетов селективных фильтров КАЦН в обеспечении входящего потока Ca^{2+} в клетки подтверждена в опытах с использованием систем гетерологической экспрессии в клетках животных и дрожжей [6; 26]. Показано, что каналы, несущие триплет GQN (10 представителей семейства КАЦН), проницаемы для Ca^{2+} и обеспечивают поглощение данного катиона из окружающего раствора. Следует также отметить, что КАЦН, исследованные в гетерологических системах, обычно демонстрируют высокую селективность по отношению к Ca^{2+} . Например, в [31] показано, что CNGC 18 (GQN) характеризуется высокой проницаемостью для Ca^{2+} и низкой проницаемостью для одновалентных катионов, таких как K^+ и Na^+ . CNGC 7–10 и CNGC 16, экспрессированные в клетках HEK293T, формируют Ca^{2+} -проницаемые проводимости, но не проводят K^+ -токи [31]. Эти данные свидетельствуют о том, что все субъединицы КАЦН, несущие триплет GQN, образуют тетрамеры с более высокой селективностью к Ca^{2+} , чем к K^+ . Некоторые гетерологически экспрессированные КАЦН активируются, когда коэкспрессированы с Ca^{2+} -зависимой протеинкиназой CPK32, т. е. регуляция их активности, вероятно, осуществляется путем прямого фосфорилирования [32]. Исследования, проведенные на intactных растениях, показали, что триплеты AND [33; 34] и GQG [35; 36] селективны к Ca^{2+} . Канал CNGC 15, экспрессированный в *Medicago truncatula*, также обнаружил особый регуляторный механизм – посредством взаимодействия с K^+ -проницаемым каналом DMI1 (Does not Make Infections 1) [30].

Данные о проницаемости субъединиц КАЦН к Ca^{2+} , полученные при помощи систем гетерологической экспрессии, недавно были подтверждены с использованием техники пэтч-кламп и методов Ca^{2+} -имиджинга в intactных клетках и тканях (см. таблицу). CNGC 2 плазматической мембраны замыкающих клеток устьиц продемонстрировали активируемые гиперполяризацией внутрьвыпрямляющие Ca^{2+} -токи, которые стимулировались циклическими нуклеотидами [33]; при этом в нокаутной линии AtCNGC 2 токи отсутствовали. Показано, что CNGC 6 формирует термочувствительную ГАП в корнях *A. thaliana*, которая стимулировалась цАМФ и блокировалась лантанидами [35]. Индуцированный высокими температурами вход Ca^{2+} через CNGC 6 вызывал увеличение экспрессии белков теплового шока, способствуя термоустойчивости арабидопсиса. Было продемонстрировано, что субъединица AtCNGC 18 ответственна за проводимость Ca^{2+} в кончике пыльцевой трубки [13]. Внутрьнаправленные токи через AtCNGC 18 имели линейный вид ВАХ и стимулировались циклическими нуклеотидами, находящимися в цитоплазме.

Таким образом, AtCNGC 18 кодирует ПНКП, ранее наблюдавшиеся в электрофизиологических исследованиях, однако идентифицированные генетически. Тем не менее дальнейшее исследование характеристик одиночных каналов, кинетики их активации и фармакологического профиля, а также оценка ортологов CNGC 18 у других видов необходимы для понимания физиологической роли данных каналов.

Ca²⁺-проводимости плазматической мембраны высших растений, выявленные при помощи техники пэтч-кламп, и соответствующие им субъединицы Ca²⁺-проницаемых ионных каналов

Plasma membrane Ca²⁺ conductances in higher plants and corresponding subunits of Ca²⁺-permeable ion channels that were confirmed by patch-clamp tests

Ткани и типы клеток: предполагаемые функции	Главные характеристики Ca ²⁺ -проводимостей	Субъединицы каналов	Библиографические ссылки
Эпидермис и кора корней: рост стресс-ответ чувствительность к АФК действие гормонов гравитропическая реакция тепловой шок восприятие механических стимулов	Одновременное наличие ГАКК, ДАКК и ПНКК Быстро- и медленноактивируемые токи в одной клетке Стимуляция циклическими нуклеотидами, АФК, пуринами, аминокислотами Механически вызванные активации одиночных каналов при помощи техники пэтч-кламп в конфигурации <i>outside-out</i>	AtCNGC 3 AtCNGC 6 AtMSL 9 AtMSL 10 AtANN 1	[29; 35; 82; 90]
Закрывающиеся клетки: закрытие устьиц	ГАКК, ПНКК Активация абсцизовой кислотой или циклическими нуклеотидами	AtCNGC 2 AtCNGC 5 AtCNGC 6	[33; 37]
Пыльцевая трубка: полярный рост	ПНКК Активация абсцизовой кислотой, циклическими нуклеотидами и D-серином	AtCNGC 18 AtGLR 1.2	[13; 61]

В [36] показано, что AtCNGC 14 ответствен за вход Ca²⁺ в цитоплазму в ответ на гравитационное воздействие. Выявлено, что CNGC 5 и CNGC 6 плазматической мембраны замыкающих клеток устьиц арабидопсиса являются цГМФ-зависимыми Ca²⁺-проницаемыми каналами, нечувствительными к абсцизовой кислоте [37]. Двойные нокаутные мутанты *cngc5cngc6* утрачивали цГМФ-активируемую Ca²⁺ проводимость. Следует также отметить, что нокаутные мутации в CNGC 1, CNGC 2 и CNGC 20 не изменяли цГМФ-активируемые Ca²⁺ токи в клетках устьиц, что свидетельствует о доминантной роли CNGC 5 и CNGC 6 в токах, активируемых циклическими нуклеотидами, в данном типе клеток.

Вход Ca²⁺ через КАЦН характеризуется особым механизмом Ca²⁺-зависимой инактивации, обеспечивающей предотвращение чрезмерного повышения уровня Ca²⁺ в цитоплазме. Это приспособление также используется для формирования (терминации) Ca²⁺-сигналов. У животных имеется механизм CDI КАЦН, зависящий от взаимодействия между кальмодулином и Ca²⁺ [38]. В клетках животных кальмодулин встраивается в КАЦН до связывания Ca²⁺ и выступает в качестве сенсора для данного катиона [39]. Молекула кальмодулина включает два Ca²⁺-связывающих мотива: спираль-петля-спираль (EF-hand) на C- и N-доменах (глобулярных C- и N-долях). Сродство Ca²⁺ в 6 раз выше для глобулярной C-доли, чем для глобулярной N-доли кальмодулина [40]. При связывании Ca²⁺ с EF-hand кальмодулин изменяет свою конформацию из апокальмодулина (закрытая форма) в Ca²⁺-кальмодулин (открытая форма), выставляя наружу гидрофобные группы метионина. В Ca²⁺-каналах мембран клеток животных Ca²⁺ имеет большее сродство к глобулярной C-доле кальмодулина, чем к глобулярной N-доле, что указывает на важнейшее значение глобулярной C-доли для поддержания низкого уровня [Ca²⁺]_{цит} [41]. При увеличении [Ca²⁺]_{цит} Ca²⁺ последовательно занимает глобулярную C-долю, а затем глобулярную N-долю, вызывая серию специфических физиологических функций как для глобулярной C-доли, так и для глобулярной N-доли. Эти события приводят к запуску CDI, при этом связывание Ca²⁺ только глобулярной C-долей вызывает CDF, стимулируя дополнительный вход Ca²⁺ после первичного входа Ca²⁺ [38; 39]. Вероятно, эти механизмы могут быть причиной сложных Ca²⁺-проводимостей у растений, хотя механизм CDF пока остается неизученным на молекулярном уровне. Например, ДАКП может быть связана с CDI. ДАКП инактивируется в течение нескольких минут после первичной активации, что, вероятно, обусловлено повышением уровня Ca²⁺ и включением Ca²⁺/кальмодулин-зависимой инактивации [11]. ГАКП в корнях растений характеризуется CDF, так как ее активность увеличивается со временем после первичной активации под действием гиперполяризации [42].

У арабидопсиса обнаружено 7 генов кальмодулинов, кодирующих 4 изоформы данного белка, и 50 генов кальмодулинподобных белков, обладающих отличающейся от кальмодулина структурой и схожей с ним функцией [42; 43]. В [43] предположено, что у растений в Ca^{2+} -зависимой инактивации КАЦН принимают участие CaMBS на C-конце, перекрывающиеся с CNBD. Согласно данной гипотезе связывание кальмодулина в присутствии Ca^{2+} приводит к замещению цАМФ или цГМФ в CNBD, что вызывает деактивацию канала [43; 44]. Недавние исследования показали, что CDI и потенциально CDF у растительных КАЦН имеют более сложный механизм, чем по первоначальному предположению [43]. Обнаружено, что белкам КАЦН растений присуще большое разнообразие по природе, количеству и организации CaMBS [45–47]. Кроме того, у КАЦН выявлены дополнительные CaMBS – изолейцин-глутамин (IQ) домены, смежные с α C-спиралью [45]. С использованием в качестве модели CNGC 12 показано, что у данного канала имеются три CaMBS – один на N-конце (NT-домен) и два на C-конце (CT- и IQ-домен) [47]. Домены NT и CT не связывают свободный кальмодулин, но характеризуются высоким сродством к комплексу Ca^{2+} -кальмодулин. Домен IQ может связывать свободный кальмодулин так же, как и комплекс Ca^{2+} -кальмодулин. Теоретически эти сайты должны быть заняты кальмодулином при уровне $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в состоянии покоя, который в норме варьирует от 70 до 120 нмоль/л. С использованием техники временной экспрессии в мутантных линиях NT, лишенных функциональных сайтов связывания кальмодулина в CNGC 12, показано, что CNGC 12 вовлечен в контроль Ca^{2+} -зависимой запрограммированной клеточной гибели в листьях табака [47].

Ионотропные глутаматные рецепторы

У растений, как и у животных, присутствуют гены ИГлуР (общепринятая мировая аббревиатура данных транспортных систем – GLR). В настоящее время накоплено достаточно данных, чтобы утверждать, что растительные ИГлуР ответственны за лигандактивируемые внутринаправленные Ca^{2+} -проводимости [16; 48–50]. У арабидопсиса было найдено 20 генов GLR [15; 51], у томата [52] и риса [53] – 13. ИГлуР арабидопсиса имеют 3 филогенетические ветви [15; 54], которые можно разделить на 10 разных подгрупп, демонстрирующих раннее ответвление от ИГлуР животных [6].

ИГлуР являются тетрамерами, состоящими из разных субъединиц, как показано для GLR 3.2 и GLR 3.4 [55]. За исключением AtGLR 2.7, ИГлуР обильно экспрессируются в корнях [56]. AtGLR 2.2 – AtGLR 2.6 отсутствуют в зеленой части растения. ИГлуР животных функционируют как Ca^{2+} -проницаемые НКК, имеющие характеристики, схожие с конститутивными ПНКП растений. ИГлуР растений имеют расхождение со структурами животных аналогов, особенно в области поры. Соответственно, они могут потенциально иметь различные проводимости и селективность. Последняя для ИГлуР растений детально не изучена.

Содержание глутамата, глицина и других аминокислот в апопласте составляет приблизительно 0,1–1,0 ммоль/л [57; 58]. Поэтому у растений, как и у животных, может осуществляться глутаматергическая Ca^{2+} -сигнализация. В [59] показано, что экзогенный глутамат в миллимолярных концентрациях индуцирует временное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ и деполяризует плазматическую мембрану клеток корня арабидопсиса. А в [16] установлено, что 30 мкмоль/л глутамата достаточно для того, чтобы вызвать значительное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ выходящее на насыщение при 0,5–1,0 ммоль/л глутамата в окружающем растворе. Глицин также индуцирует Ca^{2+} -сигналы (рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$), демонстрируя синергетический эффект с глутаматом, возможно, благодаря облегчению его связывания с ИГлуР [60]. Глутамат в субмиллимолярных концентрациях активирует лантанид- и хининчувствительные Ca^{2+} -токи, напоминающие конститутивные мгновенноактивирующиеся Ca^{2+} -проводимости [16]. Это говорит о том, что ИГлуР могут быть ответственны за часть конститутивной Ca^{2+} -проводимости, которая увеличивается при добавлении лигандов-аминокислот. В [61] была выявлена похожая глутаматактивированная Ca^{2+} -проводимость плазматической мембраны в пылевых трубках.

Экспрессия ИГлуР в ооцитах не показала Ca^{2+} -проводимостей, активирующихся аминокислотами [56], в то время как их анализ в клетках животных (НЕК293) был более успешным и продемонстрировал, что AtGLR 3.4 может формировать независимые от напряжения Ca^{2+} -проницаемые ионные каналы [62]. С использованием техники гетерологической экспрессии установлено, что ИГлуР растений опосредуют рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ и активируются широким спектром аминокислот (12 из 20 протеиногенных аминокислот) и глутатионом [48–50]. Эти данные пока не подтверждены в опытах *in vivo*.

Анализ нокаутов, лишенных функциональных ИГлуР, показал, что дисфункция GLR 3.3 и GLR 3.6 приводит к подавлению глутаматиндуцированного повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ [63; 64]. Продемонстрировано, что GLR 1.2 экспрессируется в пылевых трубках и потенциально участвует в полярном поступлении Ca^{2+} , необходимом для удлинения пылевой трубки [61]. Тем не менее некоторые данные свидетельствуют о том, что GLR 1.2 и GLR 3.7 играют менее важную роль в потоке Ca^{2+} , инициирующем рост, по сравнению с CNGC 18 [13].

Двупоровый канал TPC1

В геноме *A. thaliana* двупоровые каналы представлены только 1 геном – *TPC1* [65]. Данный белок функционирует как димер и кодирует проводимость «медленного вакуолярного» SV-канала, который охарактеризован в тонопласте многих видов высших растений [22; 66]. Гомологи TPC1 встречаются у растений, животных и протистов [66–68]. TPC1 ответствен за вакуолярную Ca^{2+} -проводимость [69]: он определяет концентрацию Ca^{2+} в вакуолярном депо [70]. Выход Ca^{2+} из вакуоли в цитоплазму постоянно контролируется во избежание значительной потери Ca^{2+} , которая могла бы нарушить обмен веществ и привести к гибели клеток. TPC1 растений селективен к катионам. Он хорошо пропускает одновалентные катионы (100–200 пс), для которых можно выявить следующий ряд селективности: $\text{Na}^+ \sim \text{Li}^+ \sim \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ [71; 72]. TPC1 также пропускает двухвалентные катионы ($\text{Ca}^{2+} \sim \text{Sr}^{2+} \sim \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$), включая Mg^{2+} , но проводимость к ним на порядок ниже, чем к K^+ [73–75]. Mg^{2+} проходит через пору в гидратированном состоянии, что является уникальной чертой TPC1 [76].

Аннексины

Аннексины – цитоплазматические белки, которые способны к Ca^{2+} -зависимому или независимому от присутствия Ca^{2+} связыванию с фосфолипидами мембран [77; 78]. Проводимость мембраны, схожая с работой ионных каналов, продемонстрирована для различных аннексинов животных с использованием искусственных липидных бислоев, однако подтверждение этих результатов *in vivo* пока не получено. Аннексины ассоциируются с запуском Ca^{2+} -зависимого апоптоза у животных [77; 78]. Тем не менее недавние работы показывают, что данное действие аннексинов может быть связано с ингибированием наружувыврямляющих K^+ -каналов [79]. У арабидопсиса найдено 8 генов (putative genes), кодирующих аннексины, у пшеницы и ячменя – 25 и 11 соответственно [80]. Аннексины у растений, отличающиеся по структуре от аналогов у животных, состоят из повторяющихся аннексиновых доменов с консервативной эндоаннексиновой областью, связывающей Ca^{2+} [78]. Функции аннексинов растений до конца не ясны, но некоторые данные указывают на то, что они участвуют во входе Ca^{2+} через плазматическую мембрану, активируемом АФК [81; 82].

Механочувствительные ионные каналы

Клеточный ответ на растяжение и механические стимулы у растений опосредован механочувствительными каналами MSL (10 генов у *A. thaliana*), MCA (2 гена у *A. thaliana*), K^+ -каналами с тандемной порой (TPK, 5 генов у *A. thaliana*) и пьезоканалами (1 ген у *A. thaliana*) [83–85]. TPK селективны для K^+ , другие механочувствительные каналы потенциально ответственны за вход Ca^{2+} в ответ на растяжение мембраны, вызванное изменением осмотического давления или механическими контактами. Кладиристический анализ генов MSL выявил наличие 4 филогенетических ветвей [6]. Классически MSL подразделяется на 3 группы – группа I (митохондриальные), группа II (хлоропластные) и группа III (находящаяся в плазматической мембране) [85]. Группы I и II имеют пять трансмембранных доменов и гипотетически формируют гомопептамеры, подобно кристаллизованному бактериальному механочувствительному «каналу малой проводимости». Пятый трансмембранный домен выступает в качестве поры, тогда как область, кодирующая сенсор напряжения, в MSL не найдена. MSL группы III (MSL 8, MSL 9 и MSL 10) локализованы в плазматической мембране и имеют шесть трансмембранных доменов, собранных в виде тетрамеров (или мультимеров), при этом шестой трансмембранный домен играет роль поры [86]. Экспрессия MSL 9 и MSL 10 в одной и той же клетке приводит к образованию гетеромерного канала с проводимостью одиночного канала 50 пСм. Индивидуально экспрессированные субъединицы MSL 9 и MSL 10 демонстрируют одиночные проводимости 45 и 140 пСм соответственно [87]. Вероятно, MSL проницаемы для анионов лучше, чем для катионов, в том числе Ca^{2+} [87]. Однако данный факт требуется подтвердить в большем количестве исследований.

MSL выполняют регуляцию запрограммированной клеточной гибели (MSL 10) [88], поддержание водного и ионного баланса в пылевых трубках (MSL 8) [86], формирование разности электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий (MSL 1) [89], механическую сенсорику корня (MSL 9 и MSL 10) [90], контроль объема хлоропластов в нормальных и стрессовых условиях (MSL 2 и MSL 3) [88], а также другие функции [85].

Субъединицы каналов MCA (MCA1 и MCA2) включают один трансмембранный домен и формируют тетрамерный комплекс с образованием Ca^{2+} -проницаемой поры вблизи N-конца, направленного в апопласт [91]. Как и у КАЦН, их активность может регулироваться увеличением цитоплазматического Ca^{2+} с помощью цитоплазматических EF-hand. При активации растяжением MCA1 и MCA2 функционируют в качестве потенциалнезависимых Ca^{2+} -проницаемых каналов с проводимостью одиночного

канала 15 или 34 пСм в плазматической мембране различных видов и тканей растений [85; 92; 93]. Гипотетически МСА могут запускать Ca^{2+} -опосредованную активацию НАДФН-оксидазы и продукцию АФК этим ферментом в ответ на гипосмотический шок.

В клетках животных так называемые пьезоканалы функционируют как сенсоры механических стимулов посредством активации Ca^{2+} -токов. Пьезоканалы содержат от двух до четырех тысяч аминокислот, собранных в 20–40 трансмембранных доменов [85]. Геном *Arabidopsis* содержит 1 ген пьезоканалов. Гипотетически он может функционировать как система транспортировки Ca^{2+} , хотя экспериментальные данные, подтверждающие функцию или ионселективность растительных пьезобелков, пока не получены.

Растительные геномы могут содержать больше генов механочувствительных каналов, чем обнаружено в настоящее время. Идентифицирован уникальный, индуцирующийся гиперосмолярностью Ca^{2+} -канал OSCA1, который способен вызывать повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ [94]. Этот белок плазматической мембраны, транспортирующий Ca^{2+} , не обладает свойствами любых ранее охарактеризованных транспортных систем растений. Он содержит одну пору между восьмым и девятым трансмембранными доменами. OSCA1-опосредуемые Ca^{2+} -токи, протестированные в клетках НЕК293, схожи с теми, которые катализируются конститутивными, независимыми от напряжения НКК. Тем не менее OSCA1 имеет проводимость одиночного канала 50 пСм, тогда как данный показатель у НКК составляет около 10 пСм. Активация OSCA1 практически не зависит от напряжения на мембране и стимулируется АФК. Гиперосмолярность – единственный известный стимул, активирующий OSCA1. OSCA представляют собой семейство генов, содержащее 15 генов в *Arabidopsis thaliana* с гомологами, существующими у других видов.

Заключение

За последнее десятилетие появилось большое количество работ, посвященных мембранному транспорту кальция. В частности, было показано, что Ca^{2+} -проницаемые каналы трех типов (ДАКК, ГАКК, ПНКК) образуют взаимосвязанную систему транспорта Ca^{2+} , обеспечивающую перенос Ca^{2+} в цитоплазму. Среди классических каналов плазматической мембраны только ДАКК пока не описаны на генетическом уровне. Все КАЦН и ИГлуР клонированы и протестированы электрофизиологически в гетерологических экспрессионных системах. Многие из них (например, CNGC 2, 5–10, 14, 16 и 18, GLR 1, 2, 3, 3, 3, 4, 3, 6 и 3, 7) показали проницаемость для Ca^{2+} в гетерологических тестах. Некоторые из КАЦН, вероятно, выступают в качестве «кальциевых каналов» растений, так как они демонстрируют большую селективность к Ca^{2+} по сравнению с одновалентными катионами. Однако это еще не подтверждено экспериментально на интактных растениях.

Значительный прогресс достигнут в понимании структуры и функционирования канала TRP1. Данный канал имеет уникальную широкую пору, позволяющую перемещать гидратированные двухвалентные катионы. Аннексины, MCA1, MCA2 и OSCA1 охарактеризованы как каналы, пропускающие Ca^{2+} . Аннексины у растений отличаются по структуре от аналогов у животных; они могут встраиваться в плазматическую мембрану, формируя канал, проводящий Ca^{2+} -токи. Показана роль механочувствительных каналов в процессах запрограммированной клеточной гибели, первичной реакции клеток на солевой стресс, поддержании формы органелл и чувствительности к АФК. Также установлено, что геном растений может содержать большее количество генов Ca^{2+} -проницаемых механочувствительных каналов, чем было предположено ранее. Например, недавно обнаружено новое семейство OSCA1, что указывает на огромный потенциал для дальнейших исследований в этой области.

Библиографические ссылки

1. Marschner H. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd edn. London: Academic Press; 2012.
2. Demidchik V, Maathuis FJ. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *Tansley Review. New Phytologist*. 2007;175(3):387–404. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
3. Dodd AN, Kudla J, Sanders D. The language of calcium signalling. *Annual Review of Plant Biology*. 2010;61:593–620. DOI: 10.1146/annurev-arplant-070109-104628.
4. Hedrich R. Ion channels in plants. *Physiological Reviews*. 2012;92(4):1777–1811. DOI: 10.1152/physrev.00038.2011.
5. Swarbrick SM, Colaço R, Davies JM. Plant calcium-permeable channels. *Plant Physiology*. 2013;163(2):514–522. DOI: 10.1104/pp.113.220855.
6. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS- Ca^{2+} Hub». *Functional Plant Biology*. 2018;45:9–27. DOI: 10.1071/FP16420.
7. Edel KH, Marchadier E, Brownlee C, Kudla J, Hetherington AM. The evolution of calcium-based signalling in plants. *Current Biology*. 2017;27(13):667–679. DOI: 10.1016/j.cub.2017.05.020.

8. White PJ, Bowen HC, Demidchik V, Nichols C, Davies JM. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*. 2002;1564(2):299–309. DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00509-6.
9. Demidchik V, Davenport RJ, Tester MA. Nonselective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2002;53:67–107. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.091901.161540.
10. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG (ed.) *Plant Electrophysiology*. Heidelberg: Springer; 2012.
11. Miedema H, Demidchik V, Véry AA, Bothwell JH, Brownlee C, Davies JM. Two voltage-dependent calcium channels co-exist in the apical plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *New Phytologist*. 2008;179(2):378–385. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02465.x.
12. Straltsova D, Chykhun P, Subramaniam S, Sosan A, Kolbanov D, Sokolik A, et al. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants. *Steroids*. 2015;97:98–106. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.10.008.
13. Gao QF, Gu LL, Wang HQ, Fei CF, Fang X, Hussain J, et al. Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca^{2+} channel in pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 2016;113(11):3096–3101. DOI: 10.1073/pnas.1524629113.
14. Tapken D, Anschütz U, Liu LH, Huelsken T, Seeböhm G, Becker D, et al. A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Science Signaling*. 2013;6(279):ra47. DOI: 10.1126/scisignal.2003762.
15. Davenport R. Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany*. 2002;90(5):549–557. DOI: 10.1093/aob/mcf228.
16. Demidchik V, Adobe P, Tester MA. Glutamate activates sodium and calcium currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta*. 2004;219:167–175.
17. Carraretto L, Checchetto V, De Bortoli S, Formentin E, Costa A, Szabó I, et al. Calcium flux across plant mitochondrial membranes: possible molecular players. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:354. DOI: 10.3389/fpls.2016.00354.
18. Zhang WH, Walker NA, Tyerman SD, Patrick JW. Fast activation of a time-dependent outward current in protoplasts derived from coats of developing *Phaseolus vulgaris* seeds. *Planta*. 2000;211(6):894–898. DOI: 10.1007/s004250000391.
19. Sosan A, Svistunenko D, Straltsova D, Tsiurkina K, Smolich I, Lawson T, et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*. 2016;85(2):245–257. DOI: 10.1111/tpj.13105.
20. Arranz-Tagarro JA, de los Ríos C, García AG, Padín JF. Recent patents on calcium channel blockers: emphasis on CNS diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2014;24(9):959–977. DOI: 10.1517/13543776.2014.940892.
21. Zepeda-Jazo I, Velarde-Buendía AM, Enriquez-Figueroa R, Bose J, Shabala S, Muñiz-Murguía J, et al. Polyamines interact with hydroxyl radicals in activating Ca^{2+} and K^{+} transport across the root epidermal plasma membranes. *Plant Physiology*. 2011;157(4):2167–2180. DOI: 10.1104/pp.111.179671.
22. Pottosin I, Velarde-Buendía AM, Bose J, Zepeda-Jazo I, Shabala S, Dobrovinskaya O. Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses. *Journal of experimental botany*. 2014;65(5):1271–1283. DOI: 10.1093/jxb/ert423.
23. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanov O. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biology*. 2015;6:260–271. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.010.
24. Demidchik V, Shabala SN, Davies JM. Spatial variation in H_2O_2 response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca^{2+} flux and plasma membrane Ca^{2+} channels. *The Plant Journal*. 2007;49(3):377–386. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02971.x.
25. Véry AA, Davies JM. Hyperpolarisation-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 2000;97(17):9801–9806. DOI: 10.1073/pnas.160250397.
26. Jammes F, Hu HC, Villiers F, Bouten R, Kwak JM. Calcium-permeable channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 2011;278(22):4262–4276. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08369.x.
27. DeFalco TA, Moeder W, Yoshioka K. Opening the gates: insights into cyclic nucleotide-gated channel-mediated signalling. *Trends in Plant Science*. 2016;21(11):903–906. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.011.
28. Jha SK, Sharma M, Pandey GK. Role of cyclic nucleotide gated channels in stress management in plants. *Current Genomics*. 2016;17(4):315–329. DOI: 10.2174/1389202917666160331202125.
29. Gobert A, Park G, Amtmann A, Sanders D, Maathuis FJ. *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57(4):791–800.
30. Charpentier M, Sun J, Vaz Martins T, Radhakrishnan GV, Findlay K, Soumpourou E, et al. Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*. 2016;352(6289):1102–1105. DOI: 10.1126/science.aae0109.
31. Gao QF, Fei CF, Dong JY, Gu Li-Li, Wang Y-F. *Arabidopsis* CNGC18 is a Ca^{2+} -permeable channel. *Molecular Plant*. 2014;7:739–743. DOI: 10.1093/mp/sst174.
32. Zhou L, Lan W, Jiang Y, Fang W, Luan S. A calcium-dependent protein kinase interacts with and activates a calcium channel to regulate pollen tube growth. *Molecular Plant*. 2014;7(2):369–376. DOI: 10.1093/mp/sst125.
33. Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, et al. Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* cyclic nucleotide gated channel 2 and innate immunity. *The Plant Cell*. 2007;19(3):1081–1095. DOI: 10.1105/tpc.106.045096.
34. Lu M, Zhang Y, Tang S, Pan J, Yu Y, Han J, et al. AtCNGC2 is involved in jasmonic acid-induced calcium mobilisation. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(3):809–819. DOI: 10.1093/jxb/erv500.
35. Gao F, Han X, Wu J, Zheng S, Shang Z, Sun D, et al. A heat-activated calcium-permeable channel – *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 6 – is involved in heat shock responses. *The Plant Journal*. 2012;70(6):1056–1069. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2012.04969.x.
36. Shih HW, DePew CL, Miller ND, Monshausen GB. The cyclic nucleotide-gated channel CNGC14 regulates root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 2015;25(23):3119–3125. DOI: 10.1016/j.cub.2015.10.025.
37. Wang YF, Munemasa S, Nishimura N, Ren HM, Robert N, Han M, et al. Identification of cyclic GMP-activated nonselective Ca^{2+} -permeable cation channels and associated CNGC5 and CNGC6 genes in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiology*. 2013;163(2):578–590. DOI: 10.1104/pp.113.225045.
38. Ben-Johny M, Dick IE, Sang L, Limpitikul WB, Kang PW, Niu J, et al. Towards a unified theory of calmodulin regulation of voltage-gated calcium and sodium channels. *Current Molecular Pharmacology*. 2015;8(2):188–205. PMID: PMC4960983.

39. Mori IC, Schroeder JI. Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology*. 2004;135(2):702–708. DOI: 0.1104/pp.104.042069.
40. Linse S, Helmersson A, Forsén S. Calcium binding to calmodulin and its globular domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(13):8050–8054. PMID: 1902469.
41. Liang H, DeMaria CD, Erickson MG, Mori MX, Alseikhan BA, Yue DT. Unified mechanisms of Ca^{2+} regulation across the Ca^{2+} channel family. *Neuron*. 2003;39(6):951–960. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00560-9.
42. Demidchik V, Bowen HC, Maathuis FJM, Shabala SN, Tester MA, White PJ, et al. Arabidopsis thaliana root nonselective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *The Plant Journal*. 2002;32(5):799–808. DOI: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01467.x.
43. Köhler C, Merkle T, Neuhaus G. Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*. 1999;18(1):97–104. DOI: 10.1046/j.1365-3113X.1999.00422.x.
44. Köhler C, Neuhaus G. Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*. 2000;471(2–3):133–136. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01383-1.
45. Fischer C, DeFalco TA, Karia P, Snedden WA, Moeder W, Yoshioka K, et al. Calmodulin as a Ca^{2+} -sensing subunit of Arabidopsis cyclic nucleotide-gated channel complexes. *Plant and Cell Physiology*. 2017;58(7):1208–1221. DOI: 10.1093/pcp/pcx052.
46. Fischer C, Kugler A, Hoth S, Dietrich P. An IQ domain mediates the interaction with calmodulin in a plant cyclic nucleotide-gated channel. *Plant and Cell Physiology*. 2013;54(4):573–584. DOI: 10.1093/pcp/pct021.
47. DeFalco TA, Marshall CB, Munro K, Kang HG, Moeder W, Ikura M, et al. Multiple calmodulin-binding sites positively and negatively regulate Arabidopsis cyclic nucleotide-gated channel. *The Plant Cell*. 2016;28(7):1738–1751. DOI: 10.1105/tpc.15.00870.
48. Forde BG, Roberts MR. Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000Prime Reports*. 2014;6:37. DOI: 10.12703/P6-37.
49. Forde BG. Glutamate signalling in roots. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65(3):779–787. DOI: 10.1093/jxb/ert335.
50. Weiland M, Mancuso S, Baluska F. Signalling via glutamate and GLRs in Arabidopsis thaliana. *Functional Plant Biology*. 2015;43(1):1–25. DOI: 0.1071/FP15109.
51. Lam H-M, Chiu J, Hsieh M-H, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, et al. Glutamate receptor genes in plants. *Nature*. 1998;396(6707):125–126. DOI: 10.1038/24066.
52. Aouini A, Matsukura C, Ezura H, Asamizu E. Characterisation of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*. 2012;493(1):36–43. DOI: 10.1016/j.gene.2011.11.037.
53. Ni J, Yu Z, Du G, Zhang Y, Taylor JL, Shen C, et al. Heterologous expression and functional analysis of rice glutamate receptor-like family indicates its role in glutamate triggered calcium flux in rice roots. *Rice*. 2016;9(1):9. DOI: 10.1186/s12284-016-0081-x.
54. Chiu J, Desalle R, Lam HM, Meisel L, Coruzzi G. Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Molecular biology and evolution*. 1999;16(6):826–838. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026167.
55. Price MB, Kong D, Okumoto S. Inter-subunit interactions between glutamate-like receptors in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*. 2013;8(12):27–34. DOI: 10.4161/psb.27034.
56. Roy SJ, Gilliam M, Berger B, Essah PA, Cheffings C, Miller AJ, et al. Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment*. 2008;31(6):861–871. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01801.x.
57. Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt HW. Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach – the comparison of metabolite concentrations in the apoplastic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Botanica Acta*. 1995;108(3):270–275. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1995.tb00860.x.
58. Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Hermann Muehling K. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum*. 2001;111(4):457–465. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110405.x.
59. Dennison KL, Spalding EP. Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2000;124(4):1511–1514. PMID: 11115867.
60. Dubos C, Huggins D, Grant GH, Knight MR, Campbell MM. A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *The Plant Journal*. 2003;35(6):800–810. DOI: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01849.x.
61. Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho J, et al. Glutamate receptor-like genes form Ca^{2+} channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*. 2011;332(6028):434–437. DOI: 10.1126/science.1201101.
62. Vincill ED, Bieck AM, Spalding EP. Ca^{2+} conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiology*. 2012;159(1):40–46. DOI: 10.1104/pp.112.197509.
63. Qi Z, Stephens NR, Spalding EP. Calcium entry mediated by GLR3.3, an Arabidopsis glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology*. 2006;142(3):963–971. DOI: 10.1104/pp.106.088989.
64. Singh SK, Chien CT, Chang IF. The Arabidopsis glutamate receptor-like gene GLR3.6 controls root development by repressing the Kip-related protein gene KRP4. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(6):1853–1869. DOI: 10.1093/jxb/erv576.
65. Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, et al. The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*. 2005;434(7031):404–408. DOI: 10.1038/nature03381.
66. Hedrich R, Marten I. TPC1-SV channels gain shape. *Molecular Plant*. 2011;4(3):428–441. DOI: 10.1093/mp/ssr017.
67. Dadacz-Narloch B, Kimura S, Kurusu T, Farmer EE, Becker D, Kuchitsu K, et al. On the cellular site of two-pore channel TPC1 action in the Poaceae. *New Phytologist*. 2013;200(3):663–674. DOI: 10.1111/nph.12402.
68. Patel S, Cai X. Evolution of acidic Ca^{2+} stores and their resident Ca^{2+} -permeable channels. *Cell Calcium*. 2015;57(3):222–230. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.12.005.
69. Pottosin I, Wherrett T, Shabala S. SV channels dominate the vacuolar Ca^{2+} release during intracellular signalling. *FEBS Letters*. 2009;583(5):921–926. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.02.009.
70. Gilliam M, Anthman A, Tyerman SD, Conn SJ. Cell-specific compartmentation of mineral nutrients is an essential mechanism for optimal plant productivity – another role for TPC1? *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(11):1656–1661. DOI: 10.4161/psb.6.11.17797.
71. Pottosin I, Dobrovinskaya O. Non-selective cation channels in plasma and vacuolar membranes and their contribution to K^{+} transport. *Journal of Plant Physiology*. 2014;171(9):732–742. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.11.013.

72. Guo J, Zeng W, Jiang Y. Tuning the ion selectivity of two-pore channels. *PNAS*. 2017;114(5):1009–1014. DOI: 10.1073/pnas.1616191114.
73. Johannes E, Sanders D. Lumenal calcium modulates unitary conductance and gating of a plant vacuolar calcium release channel. *Journal of Membrane Biology*. 1995;146(2):211–224. DOI: 10.1007/BF00238010.
74. Pottosin II, Dobrovinskaya OR, Muñiz J. Conduction of monovalent and divalent cations in the slow vacuolar channel. *Journal of Membrane Biology*. 2001;181(1):55–65. DOI: 10.1007/s0023200100073.
75. Guo J, Zeng W, Chen Q, Lee C, Chen L, Yang Y, et al. Structure of the voltage-gated two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2016;531:196–201.
76. Pottosin II, Schönknecht G. Vacuolar calcium channels. *Journal of Experimental Botany*. 2007;58(7):1559–1569. DOI: 10.1093/jxb/erm035.
77. Lizarbe MA, Barrasa JI, Olmo N, Gavilanes F, Turnay J. Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(2):2652–2683. DOI: 10.3390/ijms14022652.
78. Konopka-Postupolska D, Clark G. Annexins as overlooked regulators of membrane trafficking in plant cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(4):863. DOI: 10.3390/ijms18040863.
79. Brazier SP, Telezhkin V, Kemp PJ. Functional Interactions between BKCa α -subunit and annexin A5: implications in apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1–9. DOI: 10.1155/2016/1607092.
80. Xu L, Tang Y, Gao S, Su S, Hong L, Wang W, et al. Comprehensive analyses of the annexin gene family in wheat. *BMC Genomics*. 2016;17:415. DOI: 10.1186/s12864-016-2750-y.
81. Laohavisit A, Mortimer JC, Demidchik V, Coxon KM, Stancombe MA, Macpherson N, et al. Zea mays annexins modulate cytosolic free Ca²⁺ and generate a Ca²⁺-permeable conductance. *The Plant Cell*. 2009;21(2):479–493. DOI: 10.1105/tpc.108.059550.
82. Laohavisit A, Richards SL, Shabala L, Chen C, Colaço RD, Swarbreck SM, et al. Salinity-induced calcium signaling and root adaptation in *Arabidopsis* require the calcium regulatory protein annexin1. *Plant Physiology*. 2013;163(1):253–262. DOI: 10.1104/pp.113.217810.
83. Isayenkov S, Isner JC, Maathuis FJ. Vacuolar ion channels: roles in plant nutrition and signalling. *FEBS Letters*. 2010;584(10):1982–1988. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.050.
84. Isayenkov S, Isner JC, Maathuis FJ. Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(8):1201–1204. DOI: 10.4161/psb.6.8.15808.
85. Hamilton ES, Schlegel AM, Haswell ES. United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2015;66:113–137. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114700.
86. Hamilton ES, Haswell ES. The tension-sensitive ion transport activity of MSL8 is critical for its function in pollen hydration and germination. *Plant & Cell Physiology*. 2017;58(7):1222–1237. DOI: 10.1093/pcp/pcw230.
87. Maksaev G, Haswell ES. MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions. *PNAS*. 2012;109(46):19015–19020. DOI: 10.1073/pnas.1213931109.
88. Veley KM, Maksaev G, Frick EM, January E, Kloepper SC, Haswell ES. *Arabidopsis* MSL10 has a regulated cell death signaling activity that is separable from its mechanosensitive ion channel activity. *The Plant Cell*. 2014;26(7):3115–3131. DOI: 10.1105/tpc.114.128082.
89. Lee CP, Maksaev G, Jensen GS, Murcha MW, Wilson ME, Fricker M, et al. MSL1 is a mechanosensitive ion channel that dissipates mitochondrial membrane potential and maintains redox homeostasis in mitochondria during abiotic stress. *The Plant Journal*. 2016;88(5):809–825. DOI: 10.1111/tj.13301.
90. Peyronnet R, Haswell ES, Barbier-Brygoo H, Frachisse JM. AtMSL9 and AtMSL10: sensors of plasma membrane tension in *Arabidopsis* roots. *Plant Signaling & Behavior*. 2008;3(9):726–729. DOI: 10.4161/psb.3.9.6487.
91. Kamano S, Kume S, Iida K, Lei KJ, Nakano M, Nakayama Y, et al. Transmembrane topologies of Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(52):30901–30909. DOI: 10.1074/jbc.M115.692574.
92. Furuichi T, Iida H, Sokabe M, Tatsumi H. Expression of *Arabidopsis* MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Plant Signaling & Behavior*. 2012;7(8):1022–1026. DOI: 10.4161/psb.20783.
93. Kurusu T, Nishikawa D, Yamazaki Y, Gotoh M, Nakano M, Hamada H, et al. Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca²⁺ influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. *BMC Plant Biology*. 2012;12(1):11. DOI: 10.1186/1471-2229-12-11.
94. Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, et al. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*. 2014;514(7522):367–371. DOI: 10.1038/nature13593.

References

1. Marschner H. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd edn. London: Academic Press; 2012.
2. Demidchik V, Maathuis FJ. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *Tansley Review. New Phytologist*. 2007;175(3):387–404. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
3. Dodd AN, Kudla J, Sanders D. The language of calcium signalling. *Annual Review of Plant Biology*. 2010;61:593–620. DOI: 10.1146/annurev-arplant-070109-104628.
4. Hedrich R. Ion channels in plants. *Physiological Reviews*. 2012;92(4):1777–1811. DOI: 10.1152/physrev.00038.2011.
5. Swarbreck SM, Colaço R, Davies JM. Plant calcium-permeable channels. *Plant Physiology*. 2013;163(2):514–522. DOI: 10.1104/pp.113.220855.
6. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS-Ca²⁺ Hub». *Functional Plant Biology*. 2018;45:9–27. DOI: 10.1071/FP16420.
7. Edel KH, Marchadier E, Brownlee C, Kudla J, Hetherington AM. The evolution of calcium-based signalling in plants. *Current Biology*. 2017;27(13):667–679. DOI: 10.1016/j.cub.2017.05.020.
8. White PJ, Bowen HC, Demidchik V, Nichols C, Davies JM. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*. 2002;1564(2):299–309. DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00509-6.

9. Demidchik V, Davenport RJ, Tester MA. Nonselective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2002;53:67–107. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.091901.161540.
10. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG (ed.) *Plant Electrophysiology*. Heidelberg: Springer; 2012.
11. Miedema H, Demidchik V, Véry AA, Bothwell JH, Brownlee C, Davies JM. Two voltage-dependent calcium channels co-exist in the apical plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *New Phytologist*. 2008;179(2):378–385. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02465.x.
12. Straltsova D, Chykhun P, Subramaniam S, Sosan A, Kolbanov D, Sokolik A, et al. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants. *Steroids*. 2015;97:98–106. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.10.008.
13. Gao QF, Gu LL, Wang HQ, Fei CF, Fang X, Hussain J, et al. Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca^{2+} channel in pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 2016;113(11):3096–3101. DOI: 10.1073/pnas.1524629113.
14. Tapken D, Anschütz U, Liu LH, Huelsken T, Seeböhm G, Becker D, et al. A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Science Signaling*. 2013;6(279):ra47. DOI: 10.1126/scisignal.2003762.
15. Davenport R. Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany*. 2002;90(5):549–557. DOI: 10.1093/aob/mcf228.
16. Demidchik V, Adobea P, Tester MA. Glutamate activates sodium and calcium currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta*. 2004;219:167–175.
17. Carraretto L, Checchetto V, De Bortoli S, Formentin E, Costa A, Szabó I, et al. Calcium flux across plant mitochondrial membranes: possible molecular players. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:354. DOI: 10.3389/fpls.2016.00354.
18. Zhang WH, Walker NA, Tyerman SD, Patrick JW. Fast activation of a time-dependent outward current in protoplasts derived from coats of developing *Phaseolus vulgaris* seeds. *Planta*. 2000;211(6):894–898. DOI: 10.1007/s004250000391.
19. Sosan A, Svistunenko D, Straltsova D, Tsiurkina K, Smolich I, Lawson T, et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*. 2016;85(2):245–257. DOI: 10.1111/tjp.13105.
20. Arranz-Tagarro JA, de los Ríos C, García AG, Padín JF. Recent patents on calcium channel blockers: emphasis on CNS diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2014;24(9):959–977. DOI: 10.1517/13543776.2014.940892.
21. Zepeda-Jazo I, Velarde-Buendía AM, Enriquez-Figueroa R, Bose J, Shabala S, Muñiz-Murguía J, et al. Polyamines interact with hydroxyl radicals in activating Ca^{2+} and K^{+} transport across the root epidermal plasma membranes. *Plant Physiology*. 2011;157(4):2167–2180. DOI: 10.1104/pp.111.179671.
22. Pottosin I, Velarde-Buendía AM, Bose J, Zepeda-Jazo I, Shabala S, Dobrovinskaya O. Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses. *Journal of experimental botany*. 2014;65(5):1271–1283. DOI: 10.1093/jxb/ert423.
23. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanov O. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biology*. 2015;6:260–271. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.010.
24. Demidchik V, Shabala SN, Davies JM. Spatial variation in H_2O_2 response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca^{2+} flux and plasma membrane Ca^{2+} channels. *The Plant Journal*. 2007;49(3):377–386. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02971.x.
25. Véry AA, Davies JM. Hyperpolarisation-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 2000;97(17):9801–9806. DOI: 10.1073/pnas.160250397.
26. Jammes F, Hu HC, Villiers F, Bouten R, Kwak JM. Calcium-permeable channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 2011;278(22):4262–4276. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08369.x.
27. DeFalco TA, Moeder W, Yoshioka K. Opening the gates: insights into cyclic nucleotide-gated channel-mediated signalling. *Trends in Plant Science*. 2016;21(11):903–906. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.011.
28. Jha SK, Sharma M, Pandey GK. Role of cyclic nucleotide gated channels in stress management in plants. *Current Genomics*. 2016;17(4):315–329. DOI: 10.2174/1389202917666160331202125.
29. Gobert A, Park G, Amtmann A, Sanders D, Maathuis FJ. *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57(4):791–800.
30. Charpentier M, Sun J, Vaz Martins T, Radhakrishnan GV, Findlay K, Soumpourou E, et al. Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*. 2016;352(6289):1102–1105. DOI: 10.1126/science.aae0109.
31. Gao QF, Fei CF, Dong JY, Gu Li-Li, Wang Y-F. *Arabidopsis* CNGC18 is a Ca^{2+} -permeable channel. *Molecular Plant*. 2014;7:739–743. DOI: 10.1093/mp/sst174.
32. Zhou L, Lan W, Jiang Y, Fang W, Luan S. A calcium-dependent protein kinase interacts with and activates a calcium channel to regulate pollen tube growth. *Molecular Plant*. 2014;7(2):369–376. DOI: 10.1093/mp/sst125.
33. Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, et al. Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* cyclic nucleotide gated channel 2 and innate immunity. *The Plant Cell*. 2007;19(3):1081–1095. DOI: 10.1105/tpc.106.045096.
34. Lu M, Zhang Y, Tang S, Pan J, Yu Y, Han J, et al. AtCNGC2 is involved in jasmonic acid-induced calcium mobilisation. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(3):809–819. DOI: 10.1093/jxb/erv500.
35. Gao F, Han X, Wu J, Zheng S, Shang Z, Sun D, et al. A heat-activated calcium-permeable channel – *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 6 – is involved in heat shock responses. *The Plant Journal*. 2012;70(6):1056–1069. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2012.04969.x.
36. Shih HW, DePew CL, Miller ND, Monshausen GB. The cyclic nucleotide-gated channel CNGC14 regulates root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 2015;25(23):3119–3125. DOI: 10.1016/j.cub.2015.10.025.
37. Wang YF, Munemasa S, Nishimura N, Ren HM, Robert N, Han M, et al. Identification of cyclic GMP-activated nonselective Ca^{2+} -permeable cation channels and associated CNGC5 and CNGC6 genes in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiology*. 2013;163(2):578–590. DOI: 10.1104/pp.113.225045.
38. Ben-Johny M, Dick IE, Sang L, Limpitikul WB, Kang PW, Niu J, et al. Towards a unified theory of calmodulin regulation of voltage-gated calcium and sodium channels. *Current Molecular Pharmacology*. 2015;8(2):188–205. PMID: PMC4960983.
39. Mori IC, Schroeder JI. Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology*. 2004;135(2):702–708. DOI: 0.1104/pp.104.042069.

40. Linse S, Helmersson A, Forsén S. Calcium binding to calmodulin and its globular domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(13):8050–8054. PMID: 1902469.
41. Liang H, DeMaria CD, Erickson MG, Mori MX, Alseikhan BA, Yue DT. Unified mechanisms of Ca^{2+} regulation across the Ca^{2+} channel family. *Neuron*. 2003;39(6):951–960. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00560-9.
42. Demidchik V, Bowen HC, Maathuis FJM, Shabala SN, Tester MA, White PJ, et al. Arabidopsis thaliana root nonselective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *The Plant Journal*. 2002;32(5):799–808. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01467.x.
43. Köhler C, Merkle T, Neuhaus G. Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*. 1999;18(1):97–104. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00422.x.
44. Köhler C, Neuhaus G. Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*. 2000;471(2–3):133–136. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01383-1.
45. Fischer C, DeFalco TA, Karia P, Snedden WA, Moeder W, Yoshioka K, et al. Calmodulin as a Ca^{2+} -sensing subunit of Arabidopsis cyclic nucleotide-gated channel complexes. *Plant and Cell Physiology*. 2017;58(7):1208–1221. DOI: 10.1093/pcp/pcx052.
46. Fischer C, Kugler A, Hoth S, Dietrich P. An IQ domain mediates the interaction with calmodulin in a plant cyclic nucleotide-gated channel. *Plant and Cell Physiology*. 2013;54(4):573–584. DOI: 10.1093/pcp/pct021.
47. DeFalco TA, Marshall CB, Munro K, Kang HG, Moeder W, Ikura M, et al. Multiple calmodulin-binding sites positively and negatively regulate Arabidopsis cyclic nucleotide-gated channel. *The Plant Cell*. 2016;28(7):1738–1751. DOI: 10.1105/tpc.15.00870.
48. Forde BG, Roberts MR. Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000Prime Reports*. 2014;6:37. DOI: 10.12703/P6-37.
49. Forde BG. Glutamate signalling in roots. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65(3):779–787. DOI: 10.1093/jxb/ert335.
50. Weiland M, Mancuso S, Baluska F. Signalling via glutamate and GLRs in Arabidopsis thaliana. *Functional Plant Biology*. 2015;43(1):1–25. DOI: 10.1071/FP15109.
51. Lam H-M, Chiu J, Hsieh M-H, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, et al. Glutamate receptor genes in plants. *Nature*. 1998;396(6707):125–126. DOI: 10.1038/24066.
52. Aouini A, Matsukura C, Ezura H, Asamizu E. Characterisation of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*. 2012;493(1):36–43. DOI: 10.1016/j.gene.2011.11.037.
53. Ni J, Yu Z, Du G, Zhang Y, Taylor JL, Shen C, et al. Heterologous expression and functional analysis of rice glutamate receptor-like family indicates its role in glutamate triggered calcium flux in rice roots. *Rice*. 2016;9(1):9. DOI: 10.1186/s12284-016-0081-x.
54. Chiu J, Desalle R, Lam HM, Meisel L, Coruzzi G. Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Molecular biology and evolution*. 1999;16(6):826–838. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026167.
55. Price MB, Kong D, Okumoto S. Inter-subunit interactions between glutamate-like receptors in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*. 2013;8(12):27–34. DOI: 10.4161/psb.27034.
56. Roy SJ, Gilliam M, Berger B, Essah PA, Cheffings C, Miller AJ, et al. Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment*. 2008;31(6):861–871. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01801.x.
57. Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt HW. Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach – the comparison of metabolite concentrations in the apoplastic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Botanica Acta*. 1995;108(3):270–275. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1995.tb00860.x.
58. Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Hermann Muehling K. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum*. 2001;111(4):457–465. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110405.x.
59. Dennison KL, Spalding EP. Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2000;124(4):1511–1514. PMID: 1115867.
60. Dubos C, Huggins D, Grant GH, Knight MR, Campbell MM. A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *The Plant Journal*. 2003;35(6):800–810. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01849.x.
61. Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho J, et al. Glutamate receptor-like genes form Ca^{2+} channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*. 2011;332(6028):434–437. DOI: 10.1126/science.1201101.
62. Vincill ED, Bieck AM, Spalding EP. Ca^{2+} conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiology*. 2012;159(1):40–46. DOI: 10.1104/pp.112.197509.
63. Qi Z, Stephens NR, Spalding EP. Calcium entry mediated by GLR3.3, an Arabidopsis glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology*. 2006;142(3):963–971. DOI: 10.1104/pp.106.088989.
64. Singh SK, Chien CT, Chang IF. The Arabidopsis glutamate receptor-like gene GLR3.6 controls root development by repressing the Kip-related protein gene KRP4. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(6):1853–1869. DOI: 10.1093/jxb/erv576.
65. Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, et al. The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*. 2005;434(7031):404–408. DOI: 10.1038/nature03381.
66. Hedrich R, Marten I. TPC1-SV channels gain shape. *Molecular Plant*. 2011;4(3):428–441. DOI: 10.1093/mp/ssp017.
67. Dadacz-Narloch B, Kimura S, Kurusu T, Farmer EE, Becker D, Kuchitsu K, et al. On the cellular site of two-pore channel TPC1 action in the Poaceae. *New Phytologist*. 2013;200(3):663–674. DOI: 10.1111/nph.12402.
68. Patel S, Cai X. Evolution of acidic Ca^{2+} stores and their resident Ca^{2+} -permeable channels. *Cell Calcium*. 2015;57(3):222–230. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.12.005.
69. Pottosin I, Wherrett T, Shabala S. SV channels dominate the vacuolar Ca^{2+} release during intracellular signalling. *FEBS Letters*. 2009;583(5):921–926. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.02.009.
70. Gilliam M, Anthman A, Tyerman SD, Conn SJ. Cell-specific compartmentation of mineral nutrients is an essential mechanism for optimal plant productivity – another role for TPC1? *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(11):1656–1661. DOI: 10.4161/psb.6.11.17797.
71. Pottosin I, Dobrovinskaya O. Non-selective cation channels in plasma and vacuolar membranes and their contribution to K^{+} transport. *Journal of Plant Physiology*. 2014;171(9):732–742. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.11.013.
72. Guo J, Zeng W, Jiang Y. Tuning the ion selectivity of two-pore channels. *PNAS*. 2017;114(5):1009–1014. DOI: 10.1073/pnas.1616191114.
73. Johannes E, Sanders D. Lumenal calcium modulates unitary conductance and gating of a plant vacuolar calcium release channel. *Journal of Membrane Biology*. 1995;146(2):211–224. DOI: 10.1007/BF00238010.

74. Pottosin II, Dobrovinskaya OR, Muñiz J. Conduction of monovalent and divalent cations in the slow vacuolar channel. *Journal of Membrane Biology*. 2001;181(1):55–65. DOI: 10.1007/s0023200100073.
75. Guo J, Zeng W, Chen Q, Lee C, Chen L, Yang Y, et al. Structure of the voltage-gated two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2016;531:196–201.
76. Pottosin II, Schönknecht G. Vacuolar calcium channels. *Journal of Experimental Botany*. 2007;58(7):1559–1569. DOI: 10.1093/jxb/erm035.
77. Lizarbe MA, Barrasa JI, Olmo N, Gavilanes F, Turnay J. Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(2):2652–2683. DOI: 10.3390/ijms14022652.
78. Konopka-Postupolska D, Clark G. Annexins as overlooked regulators of membrane trafficking in plant cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(4):863. DOI: 10.3390/ijms18040863.
79. Brazier SP, Telezhkin V, Kemp PJ. Functional Interactions between BKCa α -subunit and annexin A5: implications in apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1–9. DOI: 10.1155/2016/1607092.
80. Xu L, Tang Y, Gao S, Su S, Hong L, Wang W, et al. Comprehensive analyses of the annexin gene family in wheat. *BMC Genomics*. 2016;17:415. DOI: 10.1186/s12864-016-2750-y.
81. Laohavisit A, Mortimer JC, Demidchik V, Coxon KM, Stancombe MA, Macpherson N, et al. Zea mays annexins modulate cytosolic free Ca²⁺ and generate a Ca²⁺-permeable conductance. *The Plant Cell*. 2009;21(2):479–493. DOI: 10.1105/tpc.108.059550.
82. Laohavisit A, Richards SL, Shabala L, Chen C, Colaço RD, Swarbreck SM, et al. Salinity-induced calcium signaling and root adaptation in *Arabidopsis* require the calcium regulatory protein annexin1. *Plant Physiology*. 2013;163(1):253–262. DOI: 10.1104/pp.113.217810.
83. Isayenkov S, Isner JC, Maathuis FJ. Vacuolar ion channels: roles in plant nutrition and signalling. *FEBS Letters*. 2010;584(10):1982–1988. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.050.
84. Isayenkov S, Isner JC, Maathuis FJ. Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(8):1201–1204. DOI: 10.4161/psb.6.8.15808.
85. Hamilton ES, Schlegel AM, Haswell ES. United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2015;66:113–137. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114700.
86. Hamilton ES, Haswell ES. The tension-sensitive ion transport activity of MSL8 is critical for its function in pollen hydration and germination. *Plant & Cell Physiology*. 2017;58(7):1222–1237. DOI: 10.1093/pcp/pcw230.
87. Makshev G, Haswell ES. MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions. *PNAS*. 2012;109(46):19015–19020. DOI: 10.1073/pnas.1213931109.
88. Vele KM, Makshev G, Frick EM, January E, Kloepper SC, Haswell ES. *Arabidopsis* MSL10 has a regulated cell death signaling activity that is separable from its mechanosensitive ion channel activity. *The Plant Cell*. 2014;26(7):3115–3131. DOI: 10.1105/tpc.114.128082.
89. Lee CP, Makshev G, Jensen GS, Murcha MW, Wilson ME, Fricker M, et al. MSL1 is a mechanosensitive ion channel that dissipates mitochondrial membrane potential and maintains redox homeostasis in mitochondria during abiotic stress. *The Plant Journal*. 2016;88(5):809–825. DOI: 10.1111/tpj.13301.
90. Peyronnet R, Haswell ES, Barbier-Brygoo H, Frachisse JM. AtMSL9 and AtMSL10: sensors of plasma membrane tension in *Arabidopsis* roots. *Plant Signaling & Behavior*. 2008;3(9):726–729. DOI: 10.4161/psb.3.9.6487.
91. Kamano S, Kume S, Iida K, Lei KJ, Nakano M, Nakayama Y, et al. Transmembrane topologies of Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(52):30901–30909. DOI: 10.1074/jbc.M115.692574.
92. Furuichi T, Iida H, Sokabe M, Tatsumi H. Expression of *Arabidopsis* MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Plant Signaling & Behavior*. 2012;7(8):1022–1026. DOI: 10.4161/psb.20783.
93. Kurusu T, Nishikawa D, Yamazaki Y, Gotoh M, Nakano M, Hamada H, et al. Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca²⁺ influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. *BMC Plant Biology*. 2012;12(1):11. DOI: 10.1186/1471-2229-12-11.
94. Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, et al. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*. 2014;514(7522):367–371. DOI: 10.1038/nature13593.

Статья поступила в редакцию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

L-АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА КАК АНТИОКСИДАНТ И СИГНАЛЬНО-РЕГУЛЯТОРНЫЙ АГЕНТ В КЛЕТКАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

М. А. ВОЙТЕХОВИЧ¹⁾, В. А. КУЧИНСКАЯ¹⁾,
И. Ю. НОВОСЕЛЬСКИЙ¹⁾, П. В. ГРИУСЕВИЧ¹⁾, В. В. САМОХИНА¹⁾,
В. С. МАЦКЕВИЧ¹⁾, А. И. СОКОЛИК¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Приведен обзор данных о роли аскорбиновой кислоты в качестве важнейшего антиоксиданта и регулятора физиологических процессов у растений. Биосинтез аскорбата у растений идет по нескольким уникальным для них путям, имеется система его транспорта через мембраны. Участие аскорбата в антиоксидантной защите главным образом сводится к его роли в цикле Фойер – Холливела – Асады, детоксицирующем перекись водорода во всех внутриклеточных компартментах, кроме клеточной стенки. Некоторые работы последних лет указывают на прямое участие в транспорте аскорбат-аниона ионных каналов. Появились данные о ранее неизвестных функциях аскорбата, таких как поглощение и метаболизм железа, а также генерация редокс-сигналов. Прооксидантная роль аскорбата пока изучена слабо, однако ряд исследователей считают, что он способен участвовать в синтезе наиболее реакционно-активной формы кислорода – гидроксильного радикала как в норме, так и в патологии. К наиболее важным темам будущих работ можно отнести детализацию функций L-аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя железа при поглощении данного металла корнями растений, а также роль аскорбата в индукции Ca^{2+} -сигналов, участвующих в регуляции стрессовых и гормональных ответов.

Ключевые слова: L-аскорбиновая кислота; высшие растения; *Arabidopsis thaliana* (L.); антиоксидантная и прооксидантная роль; Ca^{2+} -сигналы; сигнально-регуляторный агент; гидроксильный радикал.

Образец цитирования:

Войтехович МА, Кучинская ВА, Новосельский ИЮ, Гриусевич ПВ, Самохина ВВ, Мацкевич ВС, Соколик АИ, Демидчик ВВ. L-Аскорбиновая кислота как антиоксидант и сигнально-регуляторный агент в клетках высших растений. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;2:27–38.

For citation:

Vaitsiakhovich MA, Kuchinskaya VA, Navaselsky IYu, Hryvusevich PV, Samokhina VV, Mackievic VS, Sokolik AI, Demidchik VV. L-Ascorbic acid as an important antioxidant and signal-regulatory agent in the cells of higher plants. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:27–38 (in Russ.).

Авторы:

Мария Аркадьевна Войтехович – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Виктория Александровна Кучинская – студентка биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Илья Юрьевич Новосельский – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Полина Вацлавовна Гриусевич – магистрант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Вероника Валерьевна Самохина – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

Вера Сергеевна Мацкевич – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии и биотехнологии растений, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений, заместитель декана по научно-исследовательской работе биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Maryia A. Vaitsiakhovich, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. makovitskayama@gmail.com

Victoria A. Kuchinskaya, student at the faculty of biology. kuchinskayava@gmail.com

Ilya Yu. Navaselsky, student at the faculty of biology. ilya.novoselskiy.y@gmail.com

Palina V. Hryvusevich, master's degree student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. polinachikun@gmail.com

Veranika V. Samokhina, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. veronika.bukhovets@gmail.com

Viera S. Mackievic, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. v.mackievic@gmail.com

Anatoly I. Sokolik, PhD (biology); head of the research laboratory of plant physiology and biotechnology, associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, deputy dean for research and development, faculty of biology. sokolik@bsu.by

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. dzemidchik@bsu.by

L-ASCORBIC ACID AS AN IMPORTANT ANTIOXIDANT AND SIGNAL-REGULATORY AGENT IN THE CELLS OF HIGHER PLANTS

M. A. VAITSIAKHOVICH^a, V. A. KUCHINSKAYA^a,
I. Yu. NAVASELSKY^a, P. V. HRYVUSEVICH^a, V. V. SAMOKHINA^a,
V. S. MACKIEVIC^a, A. I. SOKOLIK^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: M. A. Vaitsiakhovich (makovitskayama@gmail.com)

This work provides an overview of data regarding ascorbic acid as an essential antioxidant and regulating agent in physiological processes in plants. The biosynthesis of ascorbate in plants occurs via several pathways; it also has its specific systems for membrane transport. The participation of ascorbate in the antioxidative defence mainly comes down to its role in the Foyer – Halliwell – Asada cycle, which is used to neutralize hydrogen peroxide within all intracellular compartments (with the exception of the cell wall). Some recent papers point to the direct involvement of ion channels in the transportation of ascorbate anions. There is evidence of ascorbate's previously unexplored functionality, such as absorption and metabolism of iron, as well as regeneration of redox-signals. The pro-oxidant aspect of ascorbate has not yet been studied in-depth; however, some researchers consider it to be capable of taking part in the synthesis of hydroxyl radicals within both normal and stress conditions. Some of the potential areas of research for the future works pertaining to this topic could include the further specification of ascorbic acid's ability to serve as a reducing agent for iron upon its uptake by the roots, as well as its role in the induction of Ca^{2+} -signals, which participate in the regulation of stress and hormonal responses.

Key words: L-ascorbic acid; higher plants; *Arabidopsis thaliana* (L.); antioxidant and prooxidant role; Ca^{2+} -signals; signal-regulatory agent; hydroxyl radical.

Введение

L-Аскорбиновая кислота, или аскорбат (АК), является ключевым антиоксидантом, кофактором редокс-ферментов и предшественником биосинтеза некоторых важных метаболитов [1; 2]. Человек полностью зависит от АК, поступающего с пищей, так как не может синтезировать его ввиду отсутствия гулонолактоноксидазы. Эволюционно уровень L-аскорбиновой кислоты увеличивался от эукариотических водорослей и мхов (0,1–1,0 ммоль/л) до высших растений (3–45 ммоль/л), предположительно приобретая роль центрального антиоксиданта клетки в аэробных условиях существования [3].

Исследования физиологических функций L-аскорбиновой кислоты классически сфокусированы на роли этого соединения как антиоксиданта [4]. Накоплено большое количество данных о позитивном влиянии АК на показатели урожая и стрессоустойчивость растений вследствие его антиоксидантных свойств. Общепринятым механизмом, при помощи которого АК может контролировать физиологические процессы, считается его воздействие на уровень H_2O_2 и других активных форм кислорода (АФК), участвующих в клеточном редокс-метаболизме и патофизиологических окислительных процессах. АК через изменение уровня АФК влияет на сигнальные пути ряда важнейших модуляторов стресс-сигналов и фитогормонов (которые стимулируют продукцию АФК), в частности абсцизовой кислоты, этилена, жасмоновой кислоты, салицилата и гиббереллинов [5–8]. Потенциально АК, представленный в растительной клетке в достаточно высоких концентрациях, может иметь собственные системы распознавания (например, на плазматической мембране), напрямую запускающие сигнальные процессы. Однако роль АК как самостоятельного индуктора сигнальных реакций на плазматической мембране и эндомембранах растительной клетки остается малоизученной. В настоящем обзоре приводятся современные данные о биосинтезе, транспорте, распределении, биохимических превращениях и физиологических функциях АК в организме растения, а также рассматривается гипотеза о возможной роли данного вещества в качестве независимого сигнально-регуляторного агента в многоклеточных растительных системах.

Биосинтез L-аскорбиновой кислоты

Синтезировать L-аскорбиновую кислоту способны большинство групп эукариотических организмов. Прокариоты в норме не обладают такой способностью. Дрожжи и многие другие грибы синтезируют аналог АК из арабинозы – D-эритрозоаскорбиновую кислоту, в биосинтезе которой участвует дегидрогеназа арабинозы и оксидаза арабино-1,4-лактона [9]. Многие беспозвоночные и рыбы не синтезируют

аскорбиновую кислоту. Тем не менее к ее синтезу способны большинство позвоночных (амфибии, рептилии, птицы, млекопитающие). Однако среди последних имеются исключения – приматы, морские свинки и человек, которые утратили способность синтезировать АК в процессе эволюции [10]. Место локализации биосинтеза L-аскорбиновой кислоты варьирует среди царств. У животных она синтезируется в печени, а на клеточном уровне ее производство завершается в эндоплазматическом ретикулуме. У растений синтез АК заканчивается в митохондриях, в дыхательной электротранспортной цепи комплекса I. Неизвестно, что повлияло на такое распределение, но существуют предположения о том, что АК был напрямую интегрирован в функционирование растительных митохондрий [4].

У животных присутствует только один путь синтеза АК – глюконовый. Он начинается с преобразования ферментами D-глюкозы до образования УДФ-D-глюкуроновой кислоты через посредников в виде D-глюкозо-6-фосфата, D-глюкозо-1-фосфата и УДФ-D-глюкозы [11]. От УДФ-D-глюкозы с помощью глюкоуроно-1-фосфат-уридилтрансферазы и глюкоурокиназы удаляется УДФ. Полученная в результате этого D-глюкуроновая кислота претерпевает инверсию углеродного скелета, восстанавливаясь до L-гулоната. При этом альдегидная группа при C1 глюкуроната в молекуле образовавшегося гулоната становится гидроксиметильной, располагаясь при C6. После взаимодействия с альдонолактолазой L-гулонат превращается в лактоновую форму – L-гулоно-1,4-лактон. Завершающей реакцией пути является его окисление L-гулоно-1,4-лактонооксидазой до L-аскорбиновой кислоты. Именно из-за мутаций в гене, кодирующем этот фермент, человек не способен синтезировать АК [5]. У животных синтез аскорбиновой кислоты может происходить также по пути, в котором интермедиатом является D-галактурононовая кислота (рис. 1) [10].

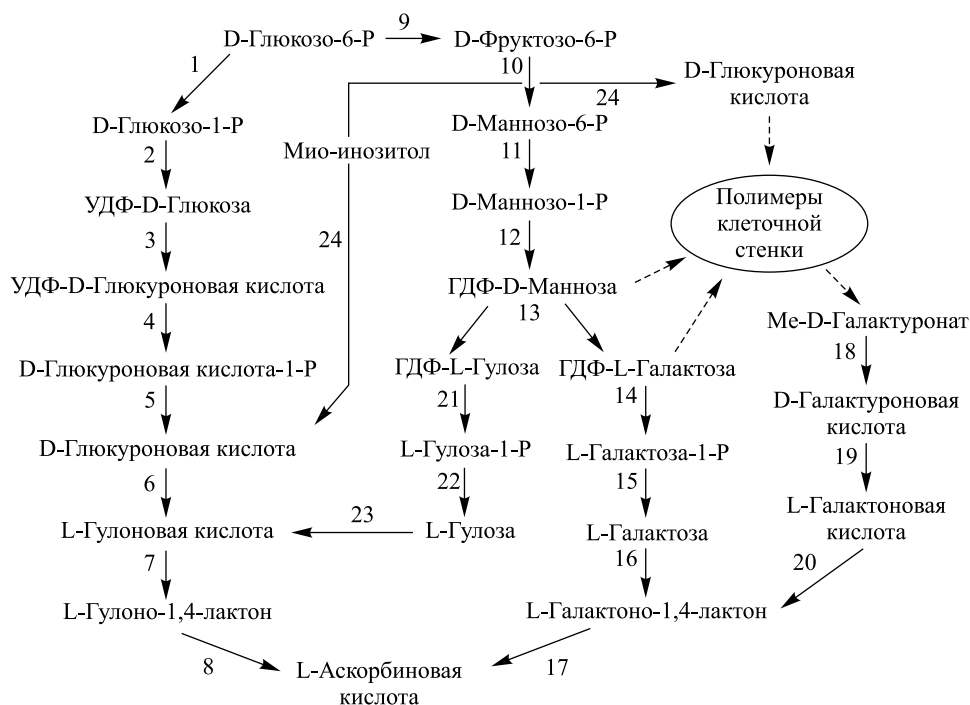


Рис. 1. Пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты у животных (реакции 1–8) и растений (реакции 9–24).

Ферменты: 1 – фосфоглюкомутаза; 2 – УДФ-глюкозопирофосфорилаза; 3 – УДФ-глюкозодегидрогеназа; 4 – глюкуроно-1-фосфат-уридилтрансфераза; 5 – глюкуронокиназа; 6 – глюкуроноатредуктаза; 7 – альдонолактоназа; 8 – гулоно-1,4-лактондегидрогеназа; 9 – глюкозо-6-фосфатизомераза; 10 – маннозо-6-фосфатизомераза; 11 – маннозофосфатмутаза; 12 – ГДФ-маннозопирофосфорилаза; 13 – ГДФ-маннозо-3',5'-эпимераза; 14 – фосфодиэстераза; 15 – сахарная фосфатаза; 16 – L-галактозодегидрогеназа; 17 – L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа; 18 – метилэстераза; 19 – D-галактуронатредуктаза; 20 – альдонолактоназа; 21 – фосфодиэстераза; 22 – сахарная фосфатаза; 23 – L-гулозодегидрогеназа; 24 – мио-инозитолоксигеназа

Fig. 1. Biosynthetic pathways of L-ascorbic acid in animals (reactions 1–8) and plants (reactions 9–24). Enzymes catalyzing the numbered reactions are: 1 – phosphoglucumutase; 2 – UDP-glucose pyrophosphorylase; 3 – UDP-glucose dehydrogenase; 4 – glucuronate-1-phosphate uridylyltransferase; 5 – glucurono kinase; 6 – glucuronate reductase; 7 – aldono-lactonase; 8 – gulono-1,4-lactone dehydrogenase; 9 – glucose-6-phosphate isomerase; 10 – mannose-6-phosphate isomerase; 11 – phosphomannomutase; 12 – GDP-mannose pyrophosphorylase (mannose-1-phosphate guanylyltransferase); 13 – GDP-mannose-3,5-epimerase; 14 – phosphodiesterase; 15 – sugar phosphatase; 16 – L-galactose dehydrogenase; 17 – L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase; 18 – methylesterase; 19 – D-galacturonate reductase; 20 – aldono-lactonase; 21 – phosphodiesterase; 22 – sugar phosphatase; 23 – L-gulose dehydrogenase; 24 – myo-inositol oxygenase

В отличие от единственного пути синтеза L-аскорбиновой кислоты у животных растения синтезируют АК как минимум двумя путями [1; 12]. Первый и основной – внутриклеточный путь Смирнова – Уилера (предложен в 1998 г.), локализованный в цитоплазме и митохондриях [1]. Этот путь начинается не от УДФ-D-глюкуроната, как у животных, а от образования ГДФ-D-маннозы с помощью поэтапного ферментативного превращения D-глюкозы. Следующим шагом является образование ГДФ-L-галактозы из-за 3'-5'-эпимеризации ГДФ-D-маннозы. Удалением из нее ГДФ получается L-галактоза. Путь завершается взаимодействием последней с L-галактозодегидрогеназой, которая расположена на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, и образованием L-галактоно-1,4-лактона, окисляемого до L-аскорбата L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой [6].

Во втором пути биосинтеза АК задействована D-глюкуроновая кислота, получаемая из разложения пектинов и полимеров клеточной стенки [12; 13]. Она преобразуется в эфир – метилгалактуронат, который превращается в L-галактонат через две реакции, катализируемые метилэстеразой и D-галактуронатредуктазой. Из него посредством альдонолактоназы получается L-галактоно-1,4-лактон, который, как и в пути Смирнова – Уилера, окисляется до L-аскорбиновой кислоты [7]. Важно отметить, что D-глюкуронат, используемый в этом пути, также может быть получен из мио-инозитола путем взаимодействия с мио-инозитолоксигеназой [8].

У растений описан еще один предложенный путь биосинтеза АК, своего рода «ответвление» от пути Смирнова – Уилера, достигающееся 5'-эпимеризацией ГДФ-D-маннозы в ГДФ-L-гулозу ГДФ-маннозо-3',5'-эпимеразой, с последующим образованием L-гулозы в результате реакций, катализируемых фосфодиэстеразой и сахарной фосфатазой [14]. Образованная L-гулоза затем конвертируется в L-гулонат L-гулозодегидрогеназой, после чего АК синтезируется теми же реакциями, что и в глюкуроновом пути животных [7].

Для синтеза АК используется только 1 % запасов глюкозы [6]. Если считать началом пути синтеза D-1-маннозу, то на выходе получаются 1 НАДН и восстановленный цитохром, а для работы ферментов требуется всего лишь 1 ГТФ [6]. Учитывая малые энергетические затраты на синтез, низкую токсичность и небольшие размеры молекулы АК, можно объяснить ее высокую концентрацию в клетках [3].

Различия в пути биосинтеза АК животных и растений показывают, насколько сильно эти два царства удалились друг от друга в процессе эволюции. Несовпадения можно проследить, начиная с первичных субстратов (D-глюкозо-1-фосфат у животных и D-фруктозо-6-фосфат у растений) и заканчивая локализацией образования АК (эндоплазматический ретикулум у животных и митохондрии у растений). В биосинтезе АК растений не участвуют уроновые кислоты и не происходит инверсии углеродного скелета, как у животных [8]. Однако не все элементы путей различны. Например, во всех путях последним этапом синтеза является окисление альдоно-1,4-лактона до L-аскорбиновой кислоты с вовлечением в процесс дегидрогеназы [15]. Помимо этого, как животными, так и растениями для получения D-глюкуроновой кислоты может использоваться мио-инозитол [8].

Содержание L-аскорбиновой кислоты в различных органах, тканях и клеточных компартментах

В растениях L-аскорбиновая кислота находится в нескольких состояниях – окисленном, восстановленном и в виде нестабильных радикалов, а также в свободном и связанном [16]. АК содержится во всех типах растительных тканей, но практически отсутствует в сухих семенах. Это может быть вызвано недостатком воды во время фазы десикации семян в процессе их созревания, что, в свою очередь, прекращает работу аскорбат-глутатионового цикла и регенерацию АК [1]. Во внеклеточном пространстве содержание АК в 5–10 раз меньше, чем внутри клетки [4]. АК пересекает клеточные мембраны с помощью специальных транспортеров и может накапливаться в разных отделах клетки. В клетках фотосинтезирующих тканей он в наибольших количествах содержится в хлоропластах и цитоплазме, где его концентрация составляет 25–50 ммоль/л [17]. В митохондриях эта концентрация ниже. Самые обедненные аскорбиновой кислотой отделы клетки – вакуоль и клеточная стенка. В них содержание данной кислоты обычно составляет 0,1–0,5 ммоль/л. Количественные показатели содержания АК в корне изучены меньше, но известно, что его уровень выше в молодых корнях [18].

В цитоплазме и органеллах преобладает восстановленная форма аскорбиновой кислоты (80–90 % от общей суммы), а в вакуолях и клеточных стенках – окисленная форма, дегидроаскорбат (ДАК) [10]. Восстановление АК из ДАК происходит за счет фермента дегидроаскорбатредуктазы (ДАКР). Отсутствие данного фермента в апопласте означает, что как только АК выходит из клетки, он подвергается окислению до ДАК. Таким образом, ДАК является преобладающей формой в апопласте, а при переносе ее обратно в цитоплазму вновь восстанавливается до L-аскорбиновой кислоты [4].

Антиоксидантные и прооксидантные свойства L-аскорбиновой кислоты

У растений антиоксидантные свойства АК связаны с целым рядом процессов, но наиболее важным и широко признанным является передача электронов в цикле Фойер – Холливела – Асады, также известном как аскорбат-глутатионовый цикл [2; 19; 20] (рис. 2). Цикл Фойер – Холливела активен внутри клетки, где он участвует в детоксикации супероксидного анионного радикала ($O_2^{\cdot -}$), который генерируется в результате «утечки» электронов на триплетный кислород (O_2) в фотосинтетической, митохондриальной, пероксисомальной и, возможно, других электронтранспортных цепях. Аскорбат-пероксидаза использует два электрона от двух молекул АК для восстановления H_2O_2 до H_2O . Эта реакция приводит к формированию моногидроаскорбат-анионного радикала, который также известен как аскорбильный радикал ($Ask^{\cdot -}$). Последний достаточно стабилен и постепенно претерпевает ферментативное или неферментативное восстановление с использованием электронов восстановленного глутатиона, другой молекулы $Ask^{\cdot -}$ или некоторых восстанавливающих агентов. Дисмутация $Ask^{\cdot -}$ приводит к формированию и накоплению ДАК, который может быть восстановлен и заново использован растением. Аскорбат-пероксидаза – обильный фермент хлоропластов, митохондрий, пероксисом, она также представлена в цитоплазме и апопласте, обеспечивает АК-зависимый контроль уровня H_2O_2 и редокс-контроль уровня АК [21].

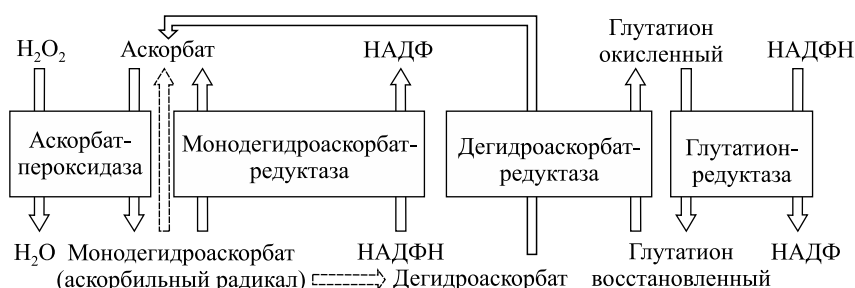


Рис. 2. Цикл Фойер – Холливела – Асады или аскорбат-глутатионовый цикл (пунктирная стрелка указывает на неферментативные реакции)

Fig. 2. Foyer – Halliwel – Asada cycle also known as ascorbate-glutathione cycle (dotted arrow indicates non-enzymatic reactions)

АК является важным для процессов регенерации α -токоферола (витамина Е) в фотосинтетических мембранах и участвует как кофактор фермента виолаксантиндеэпоксидазы, вовлеченного в защиту фотосинтетического аппарата от избыточного освещения, обеспечиваемую ксантофилловым циклом [1; 3].

В водных растворах при физиологических значениях pH L-аскорбиновая кислота представлена в виде одновалентного АК-аниона, который легко отдает электроны окисленным молекулам и выступает «скавенджером» (связывающим агентом) АФК [22]. Например, АК способен напрямую реагировать с большинством важнейших АФК, таких как супероксидный анионный радикал ($O_2^{\cdot -}$), гидроксильный радикал ($HO^{\cdot}$) и синглетный кислород, а также с окисленными производными липидов [22; 23]. Более того, АК выступает в роли важнейшего восстанавливающего агента для железа, меди и, возможно, других металлов с переходной валентностью как внутри клетки, так, вероятно, и снаружи. Восстановленные переходные металлы могут вступать в реакцию с H_2O_2 и вновь окисляться, при этом продуцируя АФК: $Fe^{3+} + K \rightarrow Fe^{2+} + MDAK$; $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$; $Cu^{2+} + АК \rightarrow Cu^{+} + MDAK$; $Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^- + OH^{\cdot}$. Эта функция АК имеет прооксидантное значение, так как Cu^{+} и Fe^{2+} являются катализаторами продукции $HO^{\cdot}$, представляющего собой наиболее мощный окислитель среди всех АФК [22; 24; 25]. Некоторые другие антиоксиданты, к примеру глутатион, НАДФН, соли мочевой кислоты и т. д., *in vitro* демонстрируют похожий эффект в присутствии переходных металлов, однако они имеют меньшее сродство. Это может указывать на то, что если АК способен проявлять прооксидантные свойства в живых системах, то на это способны и другие вещества антиоксидантной природы [22]. Таким образом, АК может участвовать в синтезе $HO^{\cdot}$ в присутствии переходных металлов и накапливающегося при стрессе или ростовой реакции H_2O_2 [24; 26–29]. $HO^{\cdot}$ играет важную роль при растяжении клеток и стрессовых ответах [30–32]. Возможно и то, что аскорбиновая кислота, катализирующая синтез $HO^{\cdot}$, способна индуцировать гибель клеток, в особенности в корне, который, вероятно, имеет меньшую антиоксидантную активность апопласта по сравнению с листом [33]. Прооксидантные свойства АК в растениях изучены недостаточно, в то время как его роль в качестве антиоксиданта привлекает внимание многочисленных исследователей и освещена в большом количестве современных обзоров и монографий [2; 22; 34].

Другие функции L-аскорбиновой кислоты

Помимо основной антиоксидантной функции известны другие роли АК в растениях. У некоторых растений он является субстратом для синтеза оксалата и тартрата [1]. АК задействован в делении растительных клеток и может участвовать в регуляции клеточного цикла во время интерфазы, в частности в фазах G1 и S [23]. АК участвует в процессах цветения растений. Показано, что снабжение растений предшественником L-аскорбиновой кислоты, L-галактоно-1,4-лактоном, приводит к задержке цветения по сравнению с таковым у контрольных растений, а дефектные по синтезу АК мутанты *Arabidopsis thaliana* зацветают раньше, чем растения дикого типа. Предполагают, что АК регулирует экспрессию генов и метаболический процесс цветения [23]. Также для АК известна роль в регуляции старения листьев. При его высокой концентрации отмирание листьев наступает позже, чем в листьях с низкой концентрацией. Данный механизм включает в себя реакцию нейтрализации аскорбатом АФК, регулирующих экспрессию генов старения, в комбинации с эффектом, который оказывает АК на синтез фитогормонов старения, таких как этилен [23]. АК может вступать в химические реакции с образованием продуктов, обладающих другими химическими свойствами. Например, при его взаимодействии с индол-3-карбинолом образуется аскорбинген – высокоактивное соединение, характерное в основном для представителей рода *Brassica*, которое участвует в образовании защитных тканей и защите растений от УФ-излучения и патогенов [35].

АК способен контролировать процессы развития растений посредством регуляции уровня биосинтеза фитогормонов [36]. Ряд авторов отмечают положительную корреляцию между высокой активностью АК-оксидазы в клеточной стенке и скоростью роста [12; 37], а также между уровнем синтеза АК и развитой архитектурой корня [38]. В то же время обработка экзогенным АК может приводить в определенных условиях к снижению ростовой активности растений [33]. АК действует как кофактор пролилгидроксилазы, которая гидроксилирует остатки пролина в гидроксипролинобогатых гликопротеинах клеточной стенки, что требуется для растяжения клетки [1]. Однако роль данной реакции АК для ростовых процессов пока не подтверждена экспериментально. АК может влиять на рост посредством стимуляции продукции $\text{HO}^{\bullet}$ при АК-зависимом восстановлении переходных металлов, связанных в клеточной стенке, в частности меди и железа [24; 28; 38–40]. Это может приводить к активации входа Ca^{2+} , индукции АФК- Ca^{2+} хаба (посредством НАДФН-оксидазы), что необходимо для устойчивой генерации АФК и входа Ca^{2+} , стимулирующих экзоцитоз и, таким образом, обеспечивающих включение новых компонентов плазматической мембраны и увеличение клетки в размерах [25; 30]. Несомненно, экзогенный АК также может дополнительно стимулировать фентонзависимое расщепление полимеров клеточной стенки для ее ослабления при растяжении протоплазмы во время роста [31].

Вовлечение АК в регуляцию физиологических процессов у растений при помощи цитоплазматического кальция и АФК

Контроль физиологических процессов при помощи цитоплазматического кальция и АФК имеет центральное значение для выживания и достижения высокой продуктивности у высших растений. Жизнь последних, привязанных к одному месту обитания, принципиально отличается от способа существования животных. Растение преодолевает неблагоприятные внешние влияния (засуха, засоление, резкое изменение температуры), не имея возможности физически избежать их. Поэтому у растений эволюционно выработалась намного более высокая фенотипическая пластичность, чем у животных, а также сформировалась уникальная по возможностям и широте восприятия внешних стимулов сигнальная система [41]. Данная система передает информацию о практически любых изменениях окружающей среды на уровень клетки, ее метаболической активности и экспрессии генов при помощи вторичных посредников. Цитоплазматический Ca^{2+} и АФК являются важнейшими вторичными посредниками между средой и растительной клеткой [42]. Изменение уровня Ca^{2+} в цитоплазме участвует в кодировании внешних сигналов (первичных посредников), переводя их на уровень специфического физиологического ответа. Специфичность возникающей в цитоплазме Ca^{2+} -волны (ее пространственно-временные параметры) не только обеспечивает запуск реакций на конкретные стрессоры или фитогормоны, но и определяет особенности роста и развития растений [43]. Обнаружено, что Ca^{2+} и АФК могут участвовать как в физиологических процессах, связанных со стрессом, так и в процессах роста, развития и дифференцировки клеток и тканей, в гравитропизме, запрограммированной клеточной гибели, дальнем транспорте веществ, активности фотосинтетического аппарата, систем поглощения минеральных элементов и воды [44]. Выявлено 7 классов специализированных Ca^{2+} -связывающих белков (вместе около 500 генов), функционирующих как одно-, двух- и трехкомпонентные системы, ответственные за трансдукцию Ca^{2+} -сигнала в цитоплазме [25].

Между повышением уровня Ca^{2+} в цитоплазме и генерацией АФК при стрессе и в ходе растяжения клетки во время роста существует тесная взаимосвязь. Известно, что Ca^{2+} -проницаемые катионные каналы активируются внеклеточными АФК, в частности гидроксильными радикалами и пероксидом водорода [28; 30; 44; 45]. В то же время вход Ca^{2+} в цитоплазму через катионные каналы приводит к активации НАДФН-оксидаз – ключевых ферментов синтеза АФК ($\text{O}_2^{\cdot-}$) – в ответ на стрессовые и ростовые стимулы в результате реакции с Ca^{2+} -связывающим EF-мотивом данных ферментов на цитоплазматической стороне [46; 47]. В настоящее время идентифицированы конкретные пары НАДФН-оксидаза / катионный канал (семейств CNGC и GLR), участвующие в формировании своего рода усилителя Ca^{2+} - и АФК-сигналов – АФК- Ca^{2+} хаба [25]. АК – необходимый компонент генерации $\text{HO}^{\cdot}$ в цикле Хабера – Вайса, протекающем в апопласте [26]. В этом случае он выступает восстановителем переходных металлов (главным образом Cu^{+2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$), передающих электрон на кислород в H_2O_2 с образованием $\text{HO}^{\cdot}$ [22]. Таким образом, сигнальная роль выделяющегося при стрессе АК практически неизбежна. Гипотетически выделение АК может вызывать синтез $\text{HO}^{\cdot}$ и активацию Ca^{2+} -проницаемых каналов. Это объясняет универсальность реакций АФК- Ca^{2+} хаба практически для любых стрессоров и ростовых стимулов. С использованием эквириновой люминометрии и техники пэтч-кламп была показана закономерность сигнально-регуляторного влияния L-аскорбиновой кислоты на уровень активности Ca^{2+} в цитоплазме клеток высших растений (рис. 3) [48].

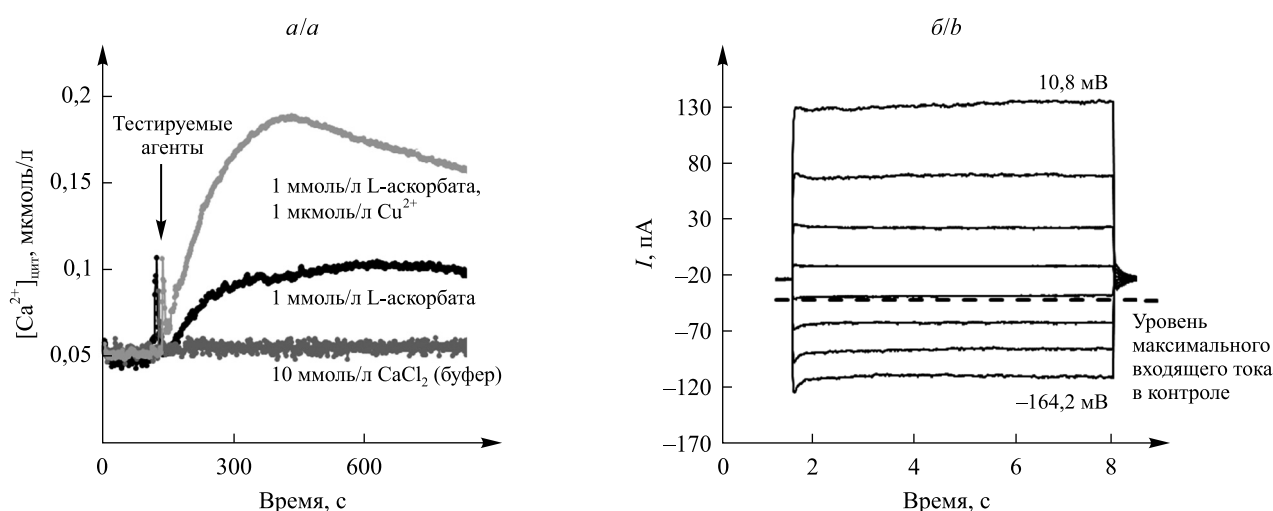


Рис. 3. Данные люминометрических и электрофизиологических тестов, демонстрирующие воздействие L-аскорбиновой кислоты на систему Ca^{2+} -сигнализации и выходящий поток АК из клеток корня *Arabidopsis thaliana* L.: а – типичные кривые временного хода увеличения цитоплазматической активности ионов кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) в ответ на введение в наружный раствор 10 ммоль/л CaCl_2 (контрольные условия), 1 ммоль/л L-аскорбиновой кислоты (визуализация типичного эффекта аскорбата) и смеси, генерирующей гидроксильные радикалы (1 ммоль/л L-аскорбата, 1 мкмоль/л CuCl_2). Использовались стандартная Ca^{2+} -эквиринная люминометрия и растения, конститутивно экспрессирующие экворин. Базовый раствор во всех опытах содержал 10 ммоль/л CaCl_2 , pH 6,0 (2 ммоль/л трис, 4 ммоль/л мес); б – типичное семейство токовых кривых, полученных в условиях доминирования выходящего потока АК-аниона. Использовалась стандартная методика пэтч-кламп. Пунктирной линией обозначен уровень максимально входящего (негативного) тока в контроле. Раствор пэтч-кламп пипетки содержал: 40 ммоль/л NaOH, 40 ммоль/л L-Asc, 10 ммоль/л NaCl, 0,75 Bapta, 0,3 ммоль/л CaCl_2 , 10 ммоль/л трис. Наружный раствор имел следующий состав: 20 ммоль/л CaCl_2 , 0,1 ммоль/л NaCl, 1 ммоль/л трис, 2 ммоль/л мес. Произведена коррекция значений фиксируемого напряжения с использованием JPCalc. Шаг фиксируемого напряжения 20 мВ. Потенциал фиксации 90 мВ

Fig. 3. The data of luminometric and electrophysiological tests demonstrating the effect of L-ascorbic acid on the Ca^{2+} signaling system and the efflux of ascorbate from the root cells of *Arabidopsis thaliana* L.: а – typical $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ transients induced by 10 mmol/L CaCl_2 (control), 1 mmol/L L-ascorbic acid (typical effect of ascorbate) and mixture generating hydroxyl radicals (1 mmol/L L-ascorbate, 1 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2). The standard Ca^{2+} -aequorin luminometry was used with plants constitutively expressing apoaequorin. The bathing solution contained 10 mmol/L CaCl_2 , pH 6.0 adjusted by 2 mmol/L Tris, 4 mmol/L Mes; б – typical Asc⁻ efflux currents through the plasma membrane of the protoplasts isolated from the *Arabidopsis thaliana* root epidermis. The standard patch-clamp techniques were used. The dashed line indicates the level of the maximum inward (negative) current in control conditions. The standard bathing solution comprised 20 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Tris, 2 mmol/L Mes. The pipette solutions (PSs) included 40 mmol/L NaOH, 40 mmol/L L-Asc, 10 mmol/L NaCl, 0.75 Bapta, 0.3 mmol/L CaCl_2 , 10 mmol/L Tris. Holding voltages were corrected by the JPCalc command in Clampex 10.6. The step of the fixed voltage was 20 mV. The fixation potential was 90 mV

Установлено, что АК индуцирует рост активности цитоплазматического Ca^{2+} в результате гидроксил-зависимой активации Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов. Эти эффекты блокировались антиоксидантами, антагонистами Ca^{2+} -каналов и хелатированием внеклеточных ионов меди и железа. Показано, что введение в среду ионов переходных металлов усиливает АК-индуцируемые Ca^{2+} -пики. Известно, что апопласт представляет собой один из наиболее обильных по содержанию пулов Cu^{+2+} и $\text{Fe}^{2+/3+}$ в растительной клетке [49; 50]. Данные металлы связываются с элементами клеточной стенки, такими как пектин, гемицеллюлоза и лигнин [27; 34; 51]. Обычно активность свободных Cu^{+2+} и $\text{Fe}^{2+/3+}$ в апопласте низка, однако их каталитическая активность (которая даже может усиливаться в органических комплексах) достаточно высока и может возрасти под действием абиотических стрессов, например во время засухи [52–54]. Это указывает на важность синтеза гидроксильных радикалов и особую роль переходных металлов в АК-зависимой сигнализации (рис. 4). Были также зарегистрированы выходящие трансмембранные токи АК-аниона, которые ответственны за выброс АК в стрессовых и других физиологических реакциях. Это согласуется с предположением, согласно которому АК является восстановителем переходных металлов в клеточной стенке и, выходя в апопласт при стрессе, способен повышать их активность. Высвобождение АК из клеток может быть опосредовано анионными каналами. Отрицательные значения мембранного потенциала на плазматической мембране ризодермальных клеток составляют от -120 до -160 мВ [55; 56]. Это создает движущую силу для массивного наружу-направленного потока Asc^- по градиенту его электрохимического потенциала через анионные каналы плазматической мембраны. Анионные каналы растений представлены тремя основными классами, кодируемыми генами, – ALMT (ALuminum-activated Malate Transporters), CLC (Chloride Channel) и SLAC (SLOW Anion Channel associated) [57]. Среди перечисленных анионных каналов только ALMT обладают способностью к проведению выходящего потока крупных органических анионов с быстрой кинетикой активации в корне. Данные каналы уникальны для растений, так как схожих генов не обнаружено в геномах животных, грибов или бактерий [57].

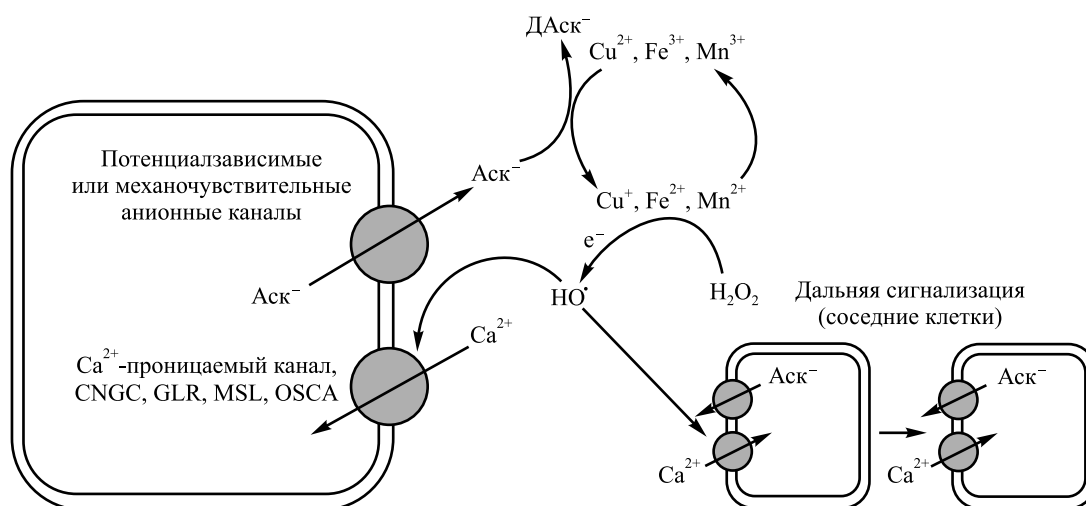


Рис. 4. Схема АК-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации в растительных тканях

Fig. 4. Scheme of the ascorbate- Ca^{2+} signaling in plant tissues

Выводы

В данном обзоре аскорбиновая кислота рассматривается как жизненно важный метаболит, необходимый для регуляции основных физиолого-биохимических процессов в растениях. Биосинтез АК у растений идет по нескольким уникальным для них путям, имеется система транспорта АК через мембраны. Некоторые современные работы указывают на вовлечение в транспорт АК анионных каналов, т. е. системы, отличающейся максимальной скоростью переноса через мембрану. Накопленные литературные данные свидетельствуют о том, что L-аскорбиновая кислота – многофункциональное соединение, участвующее в регуляции уровня АФК, окислительно-восстановительных реакциях, фотосинтезе, прорастании семян, цветении, поддержании стабильности мембран, запрограммированной клеточной гибели и т. д. В последние годы появились данные о ранее неизвестных функциях АК, таких как поглощение и метаболизм железа, а также генерация редокс-сигналов. Прооксидантная роль АК мало изучена, однако ряд исследователей считают, что он способен участвовать в синтезе наиболее реакционно-активной АФК – гидроксильного радикала как в норме, так и в патологии. Гидроксил может оказывать «позитивное» влияние

на организм, например при реализации программ роста и развития, участвовать в активации полярного входа Ca^{2+} и размягчении клеточной стенки, необходимых для роста клетки растяжением. В то же время «негативное» воздействие АК-зависимого синтеза гидроксила, вызывающего гибель клеток и отмирание тканей, наблюдается при чрезмерной продукции супероксидного радикала, избытке переходных металлов, а также мощных стрессовых воздействиях.

Ввиду неполной изученности влияния АК на физиологические процессы в растениях его дальнейшее исследование представляется весьма актуальным. К наиболее важным вопросам будущих исследований можно отнести детализацию функций АК в качестве восстановителя железа при поглощении данного металла корнями растений, а также роль АК в индукции Ca^{2+} -сигналов, участвующих в регуляции стрессовых и гормональных ответов.

Библиографические ссылки

1. Smirnoff N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2000;19:267–290. DOI: 10.1080/10409230008984166.
2. Foyer CH, Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 2011;155(1):2–18. DOI: 10.1104/pp.110.167569.
3. Gest N, Gautier H, Stevens R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(1):33–53. DOI: 10.1093/jxb/ers297.
4. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
5. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*. 2007;274(1):1–22. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x.
6. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 1998;393:5. DOI: 10.1038/30728.
7. Akram NA, Shafiq F, Ashraf M. Ascorbic acid—a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:613. DOI: 10.3389/fpls.2017.00613.
8. Valpuesta V, Botella MA. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science*. 2004;9(12):573–577. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.10.002.
9. Davey MW, Montagu MV, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(7):825–860. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6.
10. Шарова ЕИ. *Антиоксиданты растений*. Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского государственного университета; 2016.
11. Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 1996;78(6):661–669. DOI: 10.1006/anbo.1996.0175.
12. Gallie DR. L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:1–24. DOI: 10.1155/2013/795964.
13. Loewus FA, Kelly S. The metabolism of D-galacturonic acid and its methyl ester in the detached ripening strawberry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1961;95:483–493.
14. Wolucka BA, Van Montagu M. GDP-Mannose 30,50-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(48):47483–47490. DOI: 10.1074/jbc.M309135200.
15. Wheeler G, Ishikawa T, Pornsaksit V, Smirnoff N. Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *Evolutionary Biology, Plant Biology*. 2015;4. DOI: 10.7554/eLife.06369.
16. Чупахина ГН. *Система аскорбиновой кислоты растений*. Калининград: Калининградский государственный университет; 1997.
17. Zechmann B, Stumpe M, Mauch F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta*. 2011;233(1):1–12. DOI: 10.1007/s00425-010-1275-x.
18. Tedone L, Hancock RD, Alberino S, Haupt S, Viola R. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology*. 2004. DOI: 10.1186/1471-2229-4-16.
19. Foyer CH, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 1976;133(1):21–25. DOI: 10.1007/BF00386001.
20. Foyer CH, Halliwell B. Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry*. 1977;16(9):1347–1350. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88779-8.
21. Ozyigit II, Filiz E, Vatansever R, Kurtoglu KY, Koc I, Öztürk MX, et al. Identification and comparative analysis of H_2O_2 -scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. *Front Plant Science*. 2016;22(7):301. DOI: 10.3389/fpls.2016.00301.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine. Fifth edition*. [Oxford]: Oxford University Press Science; 2015;4. p.155–199.
23. Zhang Y. Biological role of ascorbate in plants. In: *Ascorbic acid in plants. Springer Briefs in Plant Science*. New York: Springer; 2013. p.7–33. DOI: 10.1007/978-1-4614-4127-4_7.
24. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 2015. Vol. 109. P. 212228. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
25. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS- Ca^{2+} Hub». *Functional Plant Biology*. 2018;45:9–27. DOI: 10.1071/FP16420.
26. Fry SC. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal*. 1998;332:507–515.

27. Fry SC, Miller JG, Dumville JC. A proposed role for copper ions in cell wall loosening. *Plant and Soil*. 2002;247(1):57–67. DOI: 10.1023/A:1021140022082.
28. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*. 2003;116:81–88.
29. Cosgrove DJ. Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000 Faculty Reviews*. 2016;5:119. DOI: 10.12688/f1000research.7180.1.
30. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 2003;422:442–446. DOI: 10.1038/nature01485.
31. Müller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszka A, Leubner-Metzger G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*. 2009;150:1855–1865. DOI: 10.1104/pp.109.139204.
32. Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, et al. The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66:37–46. DOI: 10.1093/jxb/eru398.
33. Qian HF, Peng XF, Han X, Ren J, Zhan KY, Zhu M. The stress factor, exogenous ascorbic acid, affects plant growth and the antioxidant system in *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2014;61(4):467–475. DOI: 10.1134/S1021443714040141.
34. Wertz J-L, Deleu M, Coppée S, Richel A. Hemicelluloses and lignin in biorefineries. *Green Chemistry and Chemical Engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2017.
35. Wagner AE, Rimbach G. Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clinics in Dermatology*. 2009;27(2):217–224. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.01.012.
36. Pastori GM, Kiddle G, Antoniwi J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, et al. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*. 2003;15(4):939–951. DOI: 10.1105/tpc.010538.
37. Arrigoni O. Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1994;26(4):407–419. DOI: 10.1007/BF00762782.
38. Olmos E, Kiddle G, Pellny T, Kumar S, Foyer C. Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57:1645–1655. DOI: 10.1093/jxb/erl010.
39. Herschbach C, Scheerer U, Rennenberg H. Redox states of glutathione and ascorbate in root tips of poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) depend on phloem transport from the shoot to the roots. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61:1065–1074. DOI: 10.1093/jxb/erp371.
40. Demidchik V. Reactive oxygen species and oxidative stress in plants. In: Shabala S. *Plant Stress Physiology*. Hobart: University of Tasmania; 2012. p.24–58. DOI: 10.1079/9781845939953.0024.
41. Demidchik V. *Plant Stress Physiology. Chapter 3*. Oxford: CABI; 2017. DOI: 10.1079/9781780647296.0000.
42. Steinhörst L, Kudla J. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiology*. 2013;163:471–485. DOI: 10.1104/pp.113.222950.
43. Demidchik V, Maathuis FJM. *Ion Channels and Plant Stress Responses*. Heidelberg: Springer; 2010.
44. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175:387–405. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
45. Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. The effect of Cu^{2+} on ion transport systems of the plant cell plasmalemma. *Plant Physiology*. 1997;114:1313–1325.
46. Demidchik V, Shang Z, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, et al. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels. *Plant Journal*. 2009;58:903–913. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03830.x.
47. Rounds CM, Bezanilla M. Growth mechanisms in tip-growing plant cells. *Annual Review of Plant Biology*. 2013;64:243–265. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120150.
48. Makavitskaya M, Svistunenko D, Navaselsky I, Hryvusevich P, Mackievic V, Rabadanova C, et al. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca^{2+} signals and efflux from cells via anion channels. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69(14):3477–3489. DOI: 10.1093/jxb/ery056.
49. Sattelmacher B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*. 2001;149:167–192. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00034.x.
50. Printz B, Lutts S, Hausman J-F, Sergeant K. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:601. DOI: 10.3389/fpls.2016.00601.
51. Fry SC. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*. 2004;161:641–675. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.00980.x.
52. Becana M, Klucas RV. Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(19):8958–8962. PMID: 11607326.
53. Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*. 1994;194(3):346–352. DOI: 10.1007/BF00197534.
54. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: pro-oxidant and antioxidant properties. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1997;22:861–870.
55. Demidchik V, Bowen HC, Maathuis FJ, Shabala SN, Tester MA, White PJ, et al. *Arabidopsis thaliana* root nonselective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *The Plant Journal*. 2002;32:799–808.
56. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG. *Plant Electrophysiology*. Heidelberg: Springer; 2012. p.339–370.
57. Kollist H, Jossier M, Laanemets K, Thomine S. Anion channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 2011;278:4277–4292. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08370.x.

References

1. Smirnoff N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2000;19:267–290. DOI: 10.1080/10409230008984166.
2. Foyer CH, Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 2011;155(1):2–18. DOI: 10.1104/pp.110.167569.

3. Gest N, Gautier H, Stevens R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(1):33–53. DOI: 10.1093/jxb/ers297.
4. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
5. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*. 2007;274(1):1–22. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x.
6. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 1998;393:5. DOI: 10.1038/30728.
7. Akram NA, Shafiq F, Ashraf M. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:613. DOI: 10.3389/fpls.2017.00613.
8. Valpuesta V, Botella MA. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science*. 2004;9(12):573–577. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.10.002.
9. Davey MW, Montagu MV, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(7):825–860. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6.
10. Sharova EI. *Antioksidanty rastenii*. Saint Petersburg: Publishing Saint Petersburg State University; 2016 (in Russ.).
11. Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 1996;78(6):661–669. DOI: 10.1006/anbo.1996.0175.
12. Gallie DR. L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica (Cairo)*. 2013; 2013:1–24. DOI: 10.1155/2013/795964.
13. Loewus FA, Kelly S. The metabolism of D-galacturonic acid and its methyl ester in the detached ripening strawberry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1961;95:483–493.
14. Wolucka BA, Van Montagu M. GDP-Mannose 30,50-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(48):47483–47490. DOI: 10.1074/jbc.M309135200.
15. Wheeler G, Ishikawa T, Pornsaksit V, Smirnoff N. Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *Evolutionary Biology, Plant Biology*. 2015;4. DOI: 10.7554/eLife.06369.
16. Chupakhin GN. *Sistema askorbinovoi kisloty rastenii*. Kaliningrad: Kaliningrad State University; 1997 (in Russ.).
17. Zechmann B, Stumpe M, Mauch F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta*. 2011;233(1):1–12. DOI: 10.1007/s00425-010-1275-x.
18. Tedone L, Hancock RD, Alberino S, Haupt S, Viola R. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology*. 2004. DOI: 10.1186/1471-2229-4-16.
19. Foyer CH, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 1976;133(1):21–25. DOI: 10.1007/BF00386001.
20. Foyer CH, Halliwell B. Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry*. 1977; 16(9):1347–1350. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88779-8.
21. Ozyigit II, Filiz E, Vatansever R, Kurtoglu KY, Koc I, Öztürk MX, et al. Identification and comparative analysis of H₂O₂-scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. *Front Plant Science*. 2016;22(7):301. DOI: 10.3389/fpls.2016.00301.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine. Fifth edition*. [Oxford]: Oxford University Press Science; 2015;4. p.155–199.
23. Zhang Y. Biological role of ascorbate in plants. In: *Ascorbic acid in plants. Springer Briefs in Plant Science*. New York: Springer; 2013. p.7–33. DOI: 10.1007/978-1-4614-4127-4_7.
24. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 2015. Vol. 109. P. 212228. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
25. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS-Ca²⁺ Hub». *Functional Plant Biology*. 2018;45:9–27. DOI: 10.1071/FP16420.
26. Fry SC. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal*. 1998;332:507–515.
27. Fry SC, Miller JG, Dumville JC. A proposed role for copper ions in cell wall loosening. *Plant and Soil*. 2002;247(1):57–67. DOI: 10.1023/A:1021140022082.
28. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*. 2003;116:81–88.
29. Cosgrove DJ. Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000 Faculty Reviews*. 2016;5:119. DOI: 10.12688/f1000research.7180.1.
30. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 2003;422:442–446. DOI: 10.1038/nature01485.
31. Müller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszczay A, Leubner-Metzger G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*. 2009;150:1855–1865. DOI: 10.1104/pp.109.139204.
32. Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, et al. The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66:37–46. DOI: 10.1093/jxb/eru398.
33. Qian HF, Peng XF, Han X, Ren J, Zhan KY, Zhu M. The stress factor, exogenous ascorbic acid, affects plant growth and the antioxidant system in *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2014;61(4):467–475. DOI: 10.1134/S1021443714040141.
34. Wertz J-L, Deleu M, Coppée S, Richel A. Hemicelluloses and lignin in biorefineries. *Green Chemistry and Chemical Engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2017.
35. Wagner AE, Rimbach G. Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clinics in Dermatology*. 2009;27(2): 217–224. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.01.012.
36. Pastori GM, Kiddle G, Antoniow J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, et al. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*. 2003;15(4):939–951. DOI: 10.1105/tpc.010538.
37. Arrigoni O. Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1994;26(4):407–419. DOI: 10.1007/BF00762782.

38. Olmos E, Kiddle G, Pellny T, Kumar S, Foyer C. Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57:1645–1655. DOI: 10.1093/jxb/erl010.
39. Herschbach C, Scheerer U, Rennenberg H. Redox states of glutathione and ascorbate in root tips of poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) depend on phloem transport from the shoot to the roots. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61:1065–1074. DOI: 10.1093/jxb/erp371.
40. Demidchik V. Reactive oxygen species and oxidative stress in plants. In: Shabala S. *Plant Stress Physiology*. Hobart: University of Tasmania; 2012. p.24–58. DOI: 10.1079/9781845939953.0024.
41. Demidchik V. *Plant Stress Physiology. Chapter 3*. Oxford: CABI; 2017. DOI: 10.1079/9781780647296.0000.
42. Steinhorst L, Kudla J. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiology*. 2013;163:471–485. DOI: 10.1104/pp.113.222950.
43. Demidchik V, Maathuis FJM. *Ion Channels and Plant Stress Responses*. Heidelberg: Springer; 2010.
44. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175:387–405. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
45. Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. The effect of Cu^{2+} on ion transport systems of the plant cell plasmalemma. *Plant Physiology*. 1997;114:1313–1325.
46. Demidchik V, Shang Z, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, et al. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels. *Plant Journal*. 2009;58:903–913. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03830.x.
47. Rounds CM, Bezanilla M. Growth mechanisms in tip-growing plant cells. *Annual Review of Plant Biology*. 2013;64:243–265. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120150.
48. Makavitskaya M, Svistunenko D, Navaselsky I, Hryvusevich P, Mackievic V, Rabadanova C, et al. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca^{2+} signals and efflux from cells via anion channels. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69(14):3477–3489. DOI: 10.1093/jxb/ery056.
49. Sattelmacher B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*. 2001;149:167–192. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00034.x.
50. Printz B, Lutts S, Hausman J-F, Sergeant K. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:601. DOI: 10.3389/fpls.2016.00601.
51. Fry SC. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*. 2004;161:641–675. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.00980.x.
52. Becana M, Klucas RV. Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(19):8958–8962. PMID: 11607326.
53. Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*. 1994;194(3):346–352. DOI: 10.1007/BF00197534.
54. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: pro-oxidant and antioxidant properties. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1997;22:861–870.
55. Demidchik V, Bowen HC, Maathuis FJ, Shabala SN, Tester MA, White PJ, et al. *Arabidopsis thaliana* root nonselective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *The Plant Journal*. 2002;32:799–808.
56. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG. *Plant Electrophysiology*. Heidelberg: Springer; 2012. p.339–370.
57. Kollist H, Jossier M, Laanemets K, Thomine S. Anion channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 2011;278:4277–4292. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08370.x.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

PHYSCOMITRELLA PATENS КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОРГАНИЗМ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

С. Н. ЗВОНАРЁВ¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

В работе обобщены анатомо-морфологические, молекулярно-генетические и физиологические характеристики мха *Physcomitrella patens*, представляющего собой наиболее важный растительный модельный объект, не относящийся к покрытосеменным растениям. Приводятся данные о фундаментальных открытиях в экспериментальной биологии растений с использованием данного объекта за 80 лет с момента введения его в качестве лабораторной модели. Детально проработаны вопросы изучения механизмов роста, развития, генетической стабильности, устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам при помощи *P. patens*. Оценен потенциал и проанализированы примеры применения *P. patens* в качестве биотехнологического объекта. Рассмотрены перспективы дальнейших работ на основе модельной системы *P. patens*.

Ключевые слова: мох; мохообразные; *Physcomitrella patens*.

PHYSCOMITRELLA PATENS AS A MODEL ORGANISM IN EXPERIMENTAL PLANT BIOLOGY

S. N. ZVANAROU^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: S. N. Zvanarou (zvonarevsergey.bio@gmail.com)

This paper summarizes the anatomical, morphological, molecular and physiological characteristics of moss *Physcomitrella patens*, which is the most important plant model object among the non-angiosperm species. During eighty year use of *P. patens* in plant experimental biology, a number of fundamental discoveries have been made. Studies carried out using this plant model demonstrated new mechanisms of plant cell growth, development, DNA stability, resistance to abiotic and biotic stresses. This paper also describes the potential of the *P. patens*-based applications in biotechnology and discusses examples of successful works with *P. patens* as a biotechnological object. The perspectives for further work based on the model system of *P. patens* are critically evaluated.

Key words: bryophytes; moss; *Physcomitrella patens*.

Образец цитирования:

Звонарёв СН, Демидчик ВВ. *Physcomitrella patens* как модельный организм в экспериментальной биологии растений. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018;2:39–47.

For citation:

Zvanarou SN, Demidchik VV. *Physcomitrella patens* as a model organism in experimental plant biology. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:39–47 (in Russ.).

Авторы:

Сергей Николаевич Звонарёв – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Siarhej N. Zvanarou, junior researcher at the research laboratory of plant physiology and biotechnology, faculty of biology.

zvonarevsergey.bio@gmail.com

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology); head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

Введение

В биологических исследованиях экспериментального характера широко используются модельные организмы, среди которых имеются представители наиболее важных и типичных групп живых систем. Это позволяет выявить характеристики и свойства, характерные для целой группы организмов. Практически все открытия в современной экспериментальной биологии сделаны на модельных системах. Модели должны отвечать определенным требованиям: воспроизводимость результатов, что обеспечивается большим количеством образцов; возможность стандартизации физиологических параметров, анатомии и морфологии. Современные знания о генетике и физиологии позволяют проводить экстраполяцию данных, полученных для модельных систем, на другие близкие системы и виды.

Открытия в области генетики стали основным толчком в появлении модельных организмов, использование которых ведется с начала прошлого века в связи с переходом от наблюдения к активным экспериментам с живыми системами. В настоящее время в науке применяется большое количество модельных организмов, часть из которых уже стали классическими. Среди моделей можно выделить микроорганизмы, грибы, растения, животных, вирусы и даже клеточные культуры. Основными моделями являются *Escherichia coli* (Migula), *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen), *Drosophila melanogaster* (Meigen), *Neurospora crassa* (Shear), *Arabidopsis thaliana* (L.), *Caenorhabditis elegans* (Maupas), *Mus musculus* (L.) и многие другие.

Большое значение имеет эволюционное сравнение физиологических свойств организмов. Для этого важны исследования представителей эволюционно отдаленных групп. Для высших цветковых растений это мхи и водоросли. Изучение данных групп привело к интродукции новых модельных систем и организмов. Среди представителей мохообразных таковым стал зеленый мох *Physcomitrella patens*, отличающийся эволюционной отдаленностью от высших растений и рядом преимуществ в плане культивирования и физиологического анализа.

Ботаническая характеристика *Physcomitrella patens* и мохообразных

Мохообразные, или мхи, – группа фототрофных организмов, относящихся к высшим споровым растениям. Произошли от водорослей или риниофитов примерно 450 млн лет назад, являются одними из первых среди растений, появившихся на суше [1]. В настоящее время выделяют восемь классов в составе отдела мохообразных (Bryophyta), большая часть видов которых относится к трем классам: андреевые мхи (Andreaeopsida), листостебельные мхи (Bryopsida), сфагновые мхи (Sphagnopsida) [2]. Строевые мохообразные разнообразны, встречаются виды с пластинчатыми талломами различной формы, листостебельные мхи и др. У гаметофитов многих видов развиты ризоиды. Размер таллома современных представителей мохообразных, как правило, не превышает 5–10 см, исключение составляют виды родов *Polytrichum* и *Dawsonia*, которые могут достигать размеров до 70 см [2]. В жизненном цикле мхов доминирует гаметофит, у большинства представителей спорофит развит слабо [1]. Для оплодотворения необходима влажная среда. Распространены мохообразные по всему миру, в том числе и в засушливых регионах. Большинство видов растет на почве, но некоторые представители обитают на деревьях, камнях, скалах, в пресной воде. Мохообразные являются важными компонентами биоценозов, особенно тундры, где покрывают большую часть территорий [3]. Благодаря способности удерживать воду играют важную роль в установлении водного баланса в экосистемах, в то же время могут способствовать заболачиванию почвы. Мохообразные накапливают радиоактивные элементы и другие вредные вещества, что может быть использовано для биоремедиации почв [4]. Многие мохообразные служат индикаторами загрязнения среды [3; 4]. Сфагнум и некоторые другие виды используются в медицине. Кроме того, сфагновые мхи участвуют в образовании торфа, который применяется в качестве топлива и естественного удобрения в сельском хозяйстве [4]. Также мхи представляют особый интерес для фундаментальной и прикладной науки. Благодаря тому что мхи обитают в различных условиях, они стали популярной моделью для изучения адаптаций растений к стрессовым факторам как биотической, так и абиотической природы [5; 6]. Одним из наиболее хорошо изученных представителей мохообразных является *P. patens*.

Physcomitrella patens (Hedw.) Bruch & Schimp (под *Physcomitrella*, семейство Funariaceae, порядок Funariales, класс Bryopsida, отдел Bryophyta, царство Viridiplantae) – типичный представитель листостебельных мхов (рис. 1) [2]. В течение последних 80 лет *P. patens* активно используется в исследованиях клеточных механизмов роста и развития растений, генерации и физиологического анализа нокаутов по различным генам, среди которых наиболее важными являются гены *ARPC4* и *BRICK1*, участвующие в процессе роста растяжения концевых клеток протонемы [7; 8], гены факторов транскрипции, участвующие в процессах укоренения растений [9], а также гены важных сигнальных путей животных, например ген, кодирующий белок пресенилин – один из основных компонентов сигнального пути NOTCH, нарушение работы которого может послужить причиной развития болезни Альцгеймера [10].

Наряду с папоротниками и семенными растениями у мхов, таких как *P. patens*, наблюдается чередование поколений: гаплоидное поколение, представленное гаметофитом, сменяется диплоидным – спорофитом. Однако, в отличие от папоротников и семенных растений, у мхов гаметофит является доминирующим поколением. Жизненный цикл *P. patens* (фискомитреллы) можно представить в виде схемы, изображенной на рис. 2 [5].

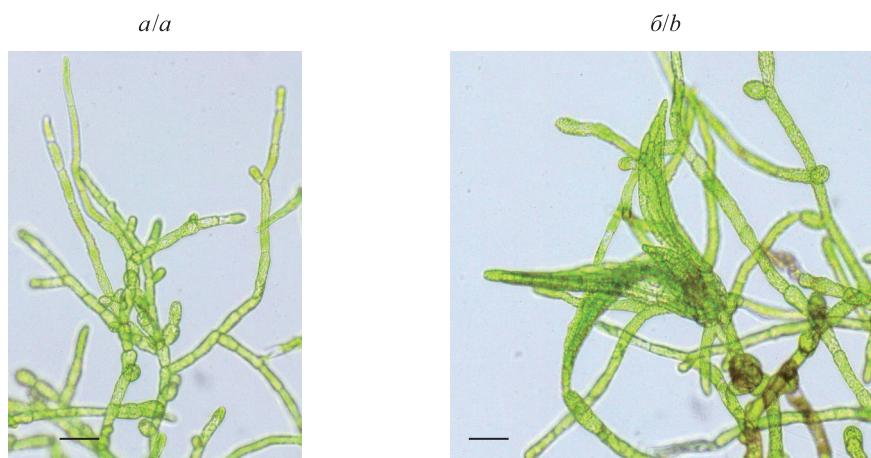


Рис. 1. Микрофотографии мха *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp:
а – хлоронема; б – развитие гаметофита из хлоронемы. Шкала: 0,5 мм
Fig. 1. Microphotographs of moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp:
а – chloronemal cells; б – growth of gametophyte from chloronema. Scale: 0.5 mm

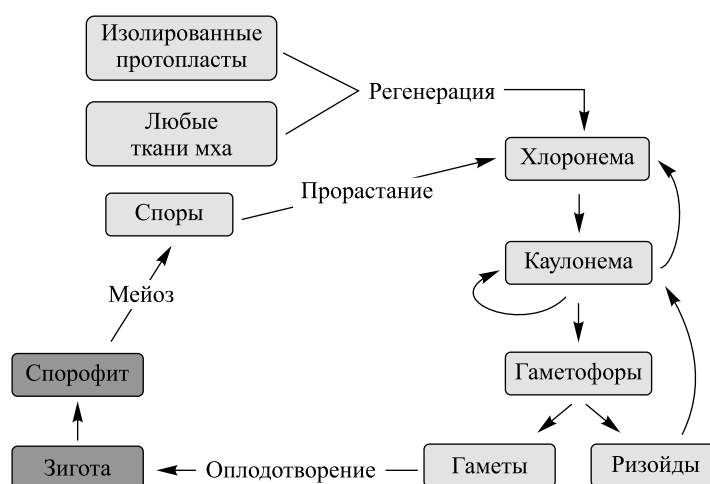


Рис. 2. Жизненный цикл мха *Physcomitrella patens*.
Светло-серым цветом обозначены гаплоидные стадии,
темно-серым – диплоидные (адаптировано из [5])
Fig. 2. Life cycle of moss *Physcomitrella patens*.

Light gray color indicates haploid stages, dark gray – diploid (adapted from [5])

Жизненный цикл *P. patens*, как и подавляющего большинства мхов, начинается с проращивания гаплоидных спор. Из споры прорастает нитчатый гаметофит, представленный первичной протонемой, которая за счет деления апикальных клеток превращается в хлоронему. Хлоронемные нити состоят из клеток с плотноупакованными большими хлоропластами. Апикальные клетки хлоронемы каждый час увеличиваются в размере на 2–5 мкм, деление апикальных клеток хлоронемных нитей происходит каждые 22–26 ч [5]. Также было обнаружено, что к делению способны и субапикальные клетки, но не более 2 раз для увеличения разветвленности хлоронемы. Со временем некоторые апикальные клетки хлоронемы развиваются в клетки каулономы. Примечательно, что этот процесс контролируется индол-3-уксусной кислотой. В настоящее время это единственный ауксин, обнаруженный у данного мха [11]. Клетки каулономы содержат меньшее количество хлоропластов, и по сравнению с клетками хлоронемы эти хлоропласты развиты гораздо хуже. Клетки каулономы увеличиваются на 25–40 мкм в час и делятся

каждые 6–8 ч [5]. С увеличением количества делений эти клетки становятся полиплоидными. Большая часть субапикальных клеток каулономы снова превращается в хлоронему, однако другая часть клеток каулономы дает начало так называемым листовым побегам, или гаметофорам, на которых позже развиваются гаметангии. В мужских гаметангиях (антеридиях) происходит развитие подвижных мужских гамет, т. е. сперматозоидов, в женских гаметангиях (архегониях) – женских гамет. Антеридии и архегонии находятся на одном побеге, поэтому чаще всего наблюдается процесс самооплодотворения. При достаточной влажности подвижные сперматозоиды оплодотворяют яйцеклетку. Из зиготы развивается спорофит, состоящий из спорофора и спорангия, в котором происходит созревание около 4000 спор.

В природе споры обычно прорастают в начале лета возле рек, озер или на заболоченных полях. Короткий световой день и температура ниже 18 °C индуцируют развитие гаметангиев и гаметогенез. Созревание спор происходит в конце лета или в начале осени. Созревшие споры зимуют в почве и при наступлении благоприятных условий прорастают. *P. patens* широко распространена в умеренных широтах от Северной Америки до Европы и Азии [11]. В лаборатории культивирование фискомитреллы осуществляется при температуре 25 °C и 16-часовом световом дне. Для индукции гаметогенеза температуру понижают до 15 °C и культивируют при 8-часовом световом дне [5].

У *P. patens* обнаружена высокая способность к регенерации. При механическом повреждении тканей спорофита или гаметофита мха, например в тканевом гомогенизаторе, наблюдается процесс регенерации, при котором из кусочков поврежденной ткани начинает развиваться протонема, как и при прорастании спор. Эту протонему можно использовать для дальнейшего культивирования, что дает возможность иметь культуру гаметофита мха в виде протонемной стадии, минуя стадию спорофита. Более того, если в лабораторных условиях использовать ткань спорофита, то при ее регенерации получается диплоидный гаметофит, который развивается аналогично гаплоидному гаметофиту, но значительно медленнее. Очень редко образуются полиплоидные штаммы *P. patens* [5]. Получение диплоидных гетерозиготных гаметофитов дает возможность определять доминантные и рецессивные гены. Также существуют различные методики создания протопластов из клеток фискомитреллы. Протопласты преимущественно используются для мутагенеза и соматической гибридизации, при этом наблюдается высокий процент (50–90 %) восстановления [11].

Эволюционные и генетические особенности *P. patens*

P. patens зарекомендовала себя в качестве удачной модельной системы при изучении молекулярных и цитогенетических основ развития растений [11]. Эволюционное расстояние между *P. patens* и покрытосеменными сопоставимо с эволюционным расстоянием между *D. melanogaster* и человеком, что дает возможность детально и глубоко изучить многие новые аспекты эволюции высших растений [11]. В 2008 г. *P. patens* стала первым представителем наземных растений, не относящихся к покрытосеменным, для которых был полностью расшифрован геном [12]. Анализ количества ДНК в клетках фискомитреллы показал, что на одну клетку в среднем приходится 0,48–0,56 пг ДНК, что соответствует 500–540 Мб [11]. В настоящее время обнаружено и аннотировано более 25 000 транскриптов. Также секвенирован геном хлоропластов и митохондрий *P. patens* [5; 11; 13]. Геном митохондрий оказался самым маленьким (105 340 пар оснований) среди всех секвенированных наземных растений [13]. Анализ генома и протеома митохондрий данного мха демонстрирует высокое родство с харовыми водорослями [14]. Однако, в отличие от водорослей и цветковых растений, *P. patens* имеет крупные, хорошо заметные под микроскопом митохондрии, что делает данный мох интересным объектом для изучения растительных митохондрий [14].

Считается, что мохообразные и цветковые растения имели общего предка 200–400 млн лет назад [5]. Сравнительный анализ транскриптомов *P. patens* и *A. thaliana* показал, что как минимум 66 % генов *A. thaliana* имеют гомологи в *P. patens* [7]. По наиболее принятому в генетике мнению, фискомитрелла насчитывает 27 хромосом – это выше, чем у других хорошо изученных представителей мхов [5].

Исследование молекулярно-генетических процессов *P. patens* позволило сделать ее модельной системой при изучении репарации ДНК с помощью гомологичной рекомбинации. Данный тип репарации наиболее важен для стабильности генома растений и животных [15]. Исследование мутантов по генам, участвующим в репарации двухцепочечных разрывов, дало возможность детально изучить роль белков комплекса MRN (комплекс из трех белков, обеспечивающий репарацию двухцепочечных разрывов ДНК) в процессах репарации у наземных растений [16].

Мхи были одними из первых среди растений, которые вышли на сушу. Их предки – водоросли обитали в соленой воде и имели хорошо развитые механизмы борьбы с избытком NaCl. В процессе эволюции наземные растения утратили часть этих механизмов, однако многие мхи их сохранили [17]. *P. patens* способна выдерживать высокие концентрации соли, т. е. является галофитом [11]. Исследования генома этого мха подтвердили наличие одновременно ряда механизмов, помогающих бороться

с высокими концентрациями NaCl как водорослям, так и высшим растениям. В частности, обнаружена Na⁺-АТФаза [18–20], близкая по строению к аналогичным ферментам у морских водорослей, и Na⁺/H⁺-антипортер (SOS-1), характерный для высших растений [19]. Эти ферменты напрямую участвуют в выведении избытка Na⁺ из клеток. Высокие концентрации соли также способны вызвать осмотический стресс. Для борьбы с таким стрессом в клетках мха присутствует белок дегидрин – продукт гена *dhnA* [18]. Получены данные, указывающие на то, что повышенные концентрации соли в среде стимулируют у фискомитреллы выработку стрессового гормона абсцизовой кислоты, индуцирующего экспрессию гена дегидрина и других генов, продукты которых помогают справиться растению с солевым и другими видами абиотических стрессов [18]. В зависимости от условий разными авторами показано, что *P. patens* способна выдерживать концентрации NaCl вплоть до 1 моль/л, что существенно выше аналогичных концентраций для большинства покрытосеменных растений [18; 20; 21]. Кроме солеустойчивости, *P. patens* показала хорошие результаты в экспериментах по выживанию растений в условиях недостатка влаги, высоких и низких температур. Установлено, что даже при потере 92 % свежей массы данный мох восстанавливался в нормальных условиях. В *P. patens* обнаружены и изучены гены, участвующие в адаптации к низким и высоким температурам [22].

Фискомитрелла широко представлена в работах по изучению взаимодействия патогенных грибов и бактерий с растительными клетками [23; 24]. За последние годы опубликованы результаты исследований взаимодействия *P. patens* с более чем 20 фитопатогенными бактериями и грибами, в том числе *Fusarium sp.*, *Phytophthora capsici* и *Botrytis cinerea*, которые являются одними из самых распространенных патогенов растений [25–27]. Изучена роль фитогормонов, мембранных рецепторов и ферментов в ответ на заражение [28].

В последние годы активно изучаются ионные каналы в клеточных мембранах *P. patens* [29–31]. Обнаружены и изучены каналы SV (Slowly activating vacuolar channel), FV (Fast activating vacuolar channel), TPC (Two-pore channel) и TPK (Two-pore K⁺ channel), участвующие в транспорте ионов K⁺, Na⁺, Ca²⁺ и др. [29]. Показано их участие в стрессовых реакциях у данного организма [30]. Кроме того, обнаружены каналы, участвующие в переносе нитратов и нитритов [31].

Использование *P. patens* в биотехнологии

Неоспоримым преимуществом культивирования *P. patens* в лабораторных условиях является способность этого мха расти на средах очень простого состава. Чаще всего используется среда Кнопа в различных модификациях с pH 6,5 [5]. При этом среда не содержит сахаров или каких-либо других органических соединений, а нитрат выступает в качестве единственного источника азота. Для ускорения роста иногда используют включение в среду тартрата аммония как дополнительного источника азота [11]. Кроме того, указанный мох легко культивируется в биореакторах (ферментерах) как открытого, так и закрытого типа с дополнительным продуванием воздухом или CO₂.

Простота культивирования вместе с уникальным метаболизмом позволяет использовать *P. patens* для получения веществ различной природы в промышленных масштабах. Из этого мха выделяют полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновую кислоту, которая является незаменимой для человека. Кроме того, с помощью мутантных и трансгенных линий этого мха производят различные терпены, фенолы, флавоноиды и другие сложные органические вещества, которые применяются в медицине [32]. Ряд экспериментов показывает, что *P. patens* может использоваться для получения гетерологичных белков. Например, налажено производство сильно гликозилированного пептидного гормона эритропоэтина [33], а также фактора H системы комплемента человека [34]. Получен трансгенный мох *P. patens*, продуцирующий артемизинин – быстродействующее вещество против малярии [35]. В настоящее время *P. patens* рассматривается как перспективный объект для получения вакцин [33].

Наиболее важные открытия, сделанные с использованием *P. patens*

Благодаря *P. patens* сделан ряд открытий в современной биологии растений. Показано, что Ca²⁺ играет ключевую роль в процессе роста растяжения клеток [36]. В экспериментах по устойчивости растений к радиации было обнаружено, что данный мох является резистентным к высоким дозам γ-излучения благодаря уникальной системе, ингибирующей образование двухцепочечных разрывов ДНК и способствующей их быстрой репарации [37]. Кроме того, *P. patens* имеет уникальный механизм биотрансформации мышьяка, что позволяет использовать ее в биоремедиации сред, загрязненных As [38]. *P. patens* сыграла немаловажную роль в открытиях в области эволюции растений. В частности, сравнительный анализ геномов и транскриптомов арабидопсиса и фискомитреллы не только подтвердил гипотезу о монофилетическом происхождении всех наземных растений, но и позволил выявить группы генов, которые в ходе

эволюции наземных растений были утеряны [39]. Благодаря секвенированию хлоропластов *P. patens* была доказана гипотеза о миграции генов из хлоропластов в ядро [40]. После того как была выявлена высокая толерантность данного растения к засухе, засолению и осмотическому стрессу, фискомитрелла стала активно использоваться для изучения стресса у растений. Выявлены гены, изменения в которых были необходимым условием для выхода растений на сушу [41]. Благодаря исследованиям, выполненным именно на *P. patens*, удалось раскрыть фундаментальные механизмы фоторегуляции и проследить эволюцию фотопротекции у наземных растений [42; 43]. Также с помощью исследований на *P. patens* удалось выявить эволюционный путь возникновения устьиц у высших растений [44].

Заключение

Проведенный анализ литературных данных показал, что *P. patens* активно используется в качестве модельной системы при разработке различных проблем экспериментальной биологии растений и биотехнологии. Мох *P. patens* стал первым видом, не относящимся к покрытосеменным, для которого среди растительных объектов был полностью расшифрован геном. Анализ генома и физиологических процессов у *P. patens* показал его сходство с харовыми водорослями и покрытосеменными растениями. Это позволяет использовать *P. patens* в ряде уникальных исследований в области эволюционной физиологии растений. Доминирование стадии гаметофита и хорошо детектируемый рост растяжением протонемы позволяют проводить тестирование процессов роста растяжением на уровне одиночной клетки. Таким образом, удалось установить ряд центральных механизмов роста и развития растений, показать роль отдельных генетических программ в данных процессах. Мох *P. patens* обладает крупными, хорошо различимыми под микроскопом митохондриями, что позволяет проводить исследования растительных митохондрий, их организации и функциональных особенностей. Уникальные свойства данного мха, хорошая изученность генетических и физиологических основ вместе с простотой культивирования позволили сделать ряд фундаментальных открытий в области физиологии и эволюции растений. Подтверждена гипотеза о монофилетическом происхождении всех наземных растений, показан эволюционный путь возникновения устьиц у высших растений и др. Открыты фундаментальные механизмы устойчивости растений к абиотическим и биотическим стресс-факторам. Уникальный метаболизм и способность расти на простых средах позволяют использовать *P. patens* в качестве биотехнологического объекта. С помощью данной системы получен ряд сложных органических веществ белковой и небелковой природы, среди которых наиболее важны гормоны и незаменимые жирные кислоты. Дальнейшее изучение *P. patens* является одним из ключевых направлений для расшифровки закономерностей эволюции наземных растений, расширяет возможности использования данного растительного организма в качестве высокоэффективного «биореактора» в биотехнологических производствах.

Библиографические ссылки

1. Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (eds.) *Bioindicators and Biomonitors: Principles, Concepts and Applications*. Oxford: Elsevier; 2003.
2. Lakatos M. Lichens and Bryophytes: Habitats and Species. *Plant Desiccation Tolerance Ecological Studies*. 2011;215:65–87. DOI: 10.1007/978-3-642-19106-0_5.
3. Pharo EJ, Zartman CE. Bryophytes in a changing landscape: The hierarchical effects of habitat fragmentation on ecological and evolutionary processes. *Biological conservation*. 2007;135(3):315–325. DOI: 10.1016/j.biocon.2006.10.016.
4. Harmens H, Foan L, Simon V, Mills G. Terrestrial mosses as biomonitors of atmospheric POPs pollution: A review. *Environmental Pollution*. 2013;173:245–254. DOI: 10.1016/j.envpol.2012.10.005.
5. Cove D, Bezanilla M, Harries P, Quatrano R. Mosses as Model Systems for the Study of Metabolism and Development. *Annual Review of Plant Biology*. 2006;57:497–520. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105338.
6. Oliver MJ, Velten J, Wood AJ. Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses. *Plant Ecology*. 2000;151(1):73–84. DOI: 10.1023/A:1026598724487.
7. Perroud PF, Quatrano RS. The role of ARPC4 in tip growth and alignment of the polar axis in filaments of *Physcomitrella patens*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2006;63(3):162–171. DOI: 10.1002/cm.20114.
8. Perroud PF, Quatrano RS. BRICK1 is required for apical cell growth in filaments of the moss *Physcomitrella patens* but not for gametophore morphology. *Plant Cell*. 2008;20(2):411–422. DOI: 10.1105/tpc.107.053256.
9. Menand B, Yi K, Jouannic S, Hoffmann L, Ryan E, Linstead P, et al. An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science*. 2007;316(5830):1477–1480. DOI: 10.1126/science.1142618.
10. Khandelwal A, Chandu D, Roe CM, Kopan R, Quatrano RS. Moonlighting activity of presenilin in plants is independent of γ -secretase and evolutionarily conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(33):13337–13342. DOI: 10.1073/pnas.0702038104.
11. Knight C, Perroud P, Cove D (eds.) *The Moss Physcomitrella patens*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. DOI: 10.1093/aob/mcp228. (Annual Plant Reviews; volume 36.)
12. Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, et al. The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science*. 2008;319(5859):64–69. DOI: 10.1126/science.1150646.

13. Terasawa K, Odahara M, Kabeya Yu, Kikugawa T, Sekine Y, Fujiwara M, et al. The mitochondrial genome of the moss *Physcomitrella patens* sheds new light on mitochondrial evolution in land plants. *Molecular Biology and Evolution*. 2006;24(3):699–709. DOI: 10.1093/molbev/msl198.
14. Mueller J, Hoernstein SN, Reski R. The mitochondrial proteome of the moss *Physcomitrella patens*. *Mitochondrion*. 2017;33: 38–44. DOI: 10.1016/j.mito.2016.07.007.
15. Rupnik A, Lowndes NF, Grenon M. MRN and the race to the break. *Chromosoma*. 2010;119:115–135. DOI: 10.1007/s00412-009-0242-4.
16. Kamisugi Y. MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research*. 2012;40:3496–3510. DOI: 10.1093/nar/gkr1272.
17. Flowers TJ, Galal HK, Bromham L. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*. 2010;37:604–612. DOI: 10.1071/FP09269.
18. Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B, Vidal S. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal*. 2006;45:237–249. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02603.x.
19. Fraile-Escanciano A, Kamisugi Y, Cuming AC, Rodríguez-Navarro A, Benito B. The SOS1 transporter of *Physcomitrella patens* mediates sodium efflux in planta. *New Phytologist*. 2010;188(3):750–761. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03405.x.
20. Benito B, Rodríguez-Navarro A. Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*. 2003;36(3):382–389.
21. Frank W, Ratnadewi D, Reski R. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*. 2005; 220(3):384–394. DOI: 10.1007/s00425-004-1351-1.
22. Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T. Role of PSBS and LHCSR in *Physcomitrella patens* acclimation to high light and low temperature. *Plant Cell Environ*. 2011;34(6):922–932. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02294.x.
23. de León IP, Montesano M. Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(2):3178–3200. DOI: 10.3390/ijms14023178.
24. de León IP. The moss *Physcomitrella patens* as a model system to study interactions between plants and phytopathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Pathogens*. 2011;2011:1–6. DOI: 10.4061/2011/719873.
25. de León IP, Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Bentancor M, Vidal S. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*. 2007;7:52. DOI: 10.1186/1471-2229-7-52.
26. Lehtonen MT, Akita M, Frank W, Reski R, Valkonen JP. Involvement of a class III peroxidase and the mitochondrial protein TSPO in oxidative burst upon treatment of moss plants with a fungal elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012;25(3): 363–371. DOI: 10.1094/MPMI-10-11-0265.
27. Overdijk EJ, Keijzer JDE, de Groot D, Schoina C, Bouwmeester K, Ketelaar T, et al. Interaction between the moss *Physcomitrella patens* and *Phytophthora*: a novel pathosystem for live-cell imaging of subcellular defense. *Journal of Microscopy*. 2016; 263(2):171–180. DOI: 10.1111/jmi.12395.
28. Lawton M, Saidasan H. Pathogenesis in mosses. In: Knight C, Perroud P-F, Cove D (eds.) *The Moss Physcomitrella patens*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. p.298–339. (Annual Plant Reviews; volume 36.) DOI: 10.1002/9781444316070.ch12.
29. Koselski M, Trebacz K, Dziubinska H. Cation-permeable vacuolar ion channels in the moss *Physcomitrella patens*: a patch-clamp study. *Planta*. 2013;238(2):357–367. DOI: 10.1007/s00425-013-1902-4.
30. Finka A, Cuendet AFH, Maathuis FJM, Saidi Y, Goloubinoff P. Plasma Membrane Cyclic Nucleotide Gated Calcium Channels Control Land Plant Thermal Sensing and Acquired Thermotolerance. *The Plant Cell*. 2012;24:3333–3348. DOI: 10.1105/tpc.112.095844.
31. Koselski M, Dziubinska H, Seta-Koselska A, Trebacz K. A nitrate-permeable ion channel in the tonoplast of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*. 2015;241(5):1207–1219. DOI: 10.1007/s00425-015-2250-3. PMID: 19812738.
32. Simonsen HT, Drew DP, Lunde C. Perspectives on Using *Physcomitrella patens* as an Alternative Production Platform for Thapsigargin and Other Terpenoid Drug Candidates. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 2009;3:1–6.
33. Rosales-Mendoza S, Orellana-Escobedo L, Romero-Maldonado A, Decker EL, Reski R. The potential of a as a platform for the production of plant-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2014;13(2):203–212. DOI: 10.1586/14760584.2014.872987.
34. Michelfelder S, Parsons J, Bohlender LL, Hoernstein SNW, Niederkrüger H, Busch A, et al. Moss-Produced, Glycosylation-Optimized Human Factor H for Therapeutic Application in Complement Disorders. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(5): 1462–1474. DOI: 10.1681/ASN.2015070745.
35. Khairul Ikram NKB, Beyraghdar Kashkooli A, Peramuna AV, van der Krol AR, Bouwmeester H, Simonsen HT. Stable Production of the Antimalarial Drug Artemisinin in the Moss *Physcomitrella patens*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2017;5:47. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00047.
36. Bascom CSJr, Winship LJ, Bezanilla M. Simultaneous imaging and functional studies reveal a tight correlation between calcium and actin networks. *Plant biology*. 2018;115(12):1–10. DOI: 10.1073/pnas.1711037115.
37. Yokota Y, Sakamoto AN. The Moss *Physcomitrella patens* is Hyperresistant to DNA Double-Strand Breaks Induced by γ -Irradiation. *Genes*. 2018;9(2):1–11. DOI: 10.3390/genes9020076.
38. Yin X, Wang L, Liu Y, Jiang T, Gao J. Characterization of Arsenic Biotransformation by a Typical Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017;98(2):251–256. DOI: 10.1007/s00128-016-1997-y.
39. Nishiyama T, Fujita T, Shin-I T, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, et al. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(13):8007–8012. DOI: 10.1073/pnas.0932694100.
40. Sugiura C, Kobayashi Y, Aoki S, Sugita M. Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of rpoA from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(18):5324–5331. DOI: 10.1093/nar/gkg726.
41. Cuming AC, Cho SH, Kamisugi Y, Graham H, Quatrano RS. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*. 2007;176(2):275–287. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02187.x.
42. Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M, Wada M. Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*. 2002;14(2):373–386. DOI: 10.1105/tpc.010388.

43. Hohe A, Rensing SA, Mildner M, Lang D, Reski R. Day length and temperature strongly influence sexual reproduction and expression of a novel MADS-box gene in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant biology*. 2002;4:595–602. DOI: 10.1055/s-2002-35440.
44. Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T. *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(24):11128–11133. DOI: 10.1073/pnas.1002873107.

References

1. Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (eds.) *Bioindicators and Biomonitors: Principles, Concepts and Applications*. Oxford: Elsevier; 2003.
2. Lakatos M. Lichens and Bryophytes: Habitats and Species. *Plant Desiccation Tolerance Ecological Studies*. 2011;215:65–87. DOI: 10.1007/978-3-642-19106-0_5.
3. Pharo EJ, Zartman CE. Bryophytes in a changing landscape: The hierarchical effects of habitat fragmentation on ecological and evolutionary processes. *Biological conservation*. 2007;135(3):315–325. DOI: 10.1016/j.biocon.2006.10.016.
4. Harmens H, Foan L, Simon V, Mills G. Terrestrial mosses as biomonitors of atmospheric POPs pollution: A review. *Environmental Pollution*. 2013;173:245–254. DOI: 10.1016/j.envpol.2012.10.005.
5. Cove D, Bezanilla M, Harries P, Quatrano R. Mosses as Model Systems for the Study of Metabolism and Development. *Annual Review of Plant Biology*. 2006;57:497–520. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105338.
6. Oliver MJ, Velten J, Wood AJ. Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses. *Plant Ecology*. 2000;151(1):73–84. DOI: 10.1023/A:1026598724487.
7. Perroud PF, Quatrano RS. The role of ARPC4 in tip growth and alignment of the polar axis in filaments of *Physcomitrella patens*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2006;63(3):162–171. DOI: 10.1002/cm.20114.
8. Perroud PF, Quatrano RS. BRICK1 is required for apical cell growth in filaments of the moss *Physcomitrella patens* but not for gametophore morphology. *Plant Cell*. 2008;20(2):411–422. DOI: 10.1105/tpc.107.053256.
9. Menand B, Yi K, Jouannic S, Hoffmann L, Ryan E, Linstead P, et al. An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science*. 2007;316(5830):1477–1480. DOI: 10.1126/science.1142618.
10. Khandelwal A, Chandu D, Roe CM, Kopan R, Quatrano RS. Moonlighting activity of presenilin in plants is independent of γ -secretase and evolutionarily conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(33):13337–13342. DOI: 10.1073/pnas.0702038104.
11. Knight C, Perroud P, Cove D (eds.) *The Moss Physcomitrella patens*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. DOI: 10.1093/aob/mcp228. (Annual Plant Reviews; volume 36.)
12. Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, et al. The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science*. 2008;319(5859):64–69. DOI: 10.1126/science.1150646.
13. Terasawa K, Odahara M, Kabeya Yu, Kikugawa T, Sekine Y, Fujiwara M, et al. The mitochondrial genome of the moss *Physcomitrella patens* sheds new light on mitochondrial evolution in land plants. *Molecular Biology and Evolution*. 2006;24(3):699–709. DOI: 10.1093/molbev/msl198.
14. Mueller J, Hoernstein SN, Reski R. The mitochondrial proteome of the moss *Physcomitrella patens*. *Mitochondrion*. 2017;33:38–44. DOI: 10.1016/j.mito.2016.07.007.
15. Rupnik A, Lowndes NF, Grenon M. MRN and the race to the break. *Chromosoma*. 2010;119:115–135. DOI: 10.1007/s00412-009-0242-4.
16. Kamisugi Y. MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research*. 2012;40:3496–3510. DOI: 10.1093/nar/gkr1272.
17. Flowers TJ, Galal HK, Bromham L. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*. 2010;37:604–612. DOI: 10.1071/FP09269.
18. Saaavedra L, Svensson J, Carballo V, Izemendi D, Welin B, Vidal S. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal*. 2006;45:237–249. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02603.x.
19. Fraile-Escanciano A, Kamisugi Y, Cuming AC, Rodríguez-Navarro A, Benito B. The SOS1 transporter of *Physcomitrella patens* mediates sodium efflux in planta. *New Phytologist*. 2010;188(3):750–761. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03405.x.
20. Benito B, Rodríguez-Navarro A. Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*. 2003;36(3):382–389.
21. Frank W, Ratnadewi D, Reski R. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*. 2005;220(3):384–394. DOI: 10.1007/s00425-004-1351-1.
22. Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T. Role of PSBS and LHCSR in *Physcomitrella patens* acclimation to high light and low temperature. *Plant Cell Environ*. 2011;34(6):922–932. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02294.x.
23. de León IP, Montesano M. Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(2):3178–3200. DOI: 10.3390/ijms14023178.
24. de León IP. The moss *Physcomitrella patens* as a model system to study interactions between plants and phytopathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Pathogens*. 2011;2011:1–6. DOI: 10.4061/2011/719873.
25. de León IP, Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Bentancor M, Vidal S. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*. 2007;7:52. DOI: 10.1186/1471-2229-7-52.
26. Lehtonen MT, Akita M, Frank W, Reski R, Valkonen JP. Involvement of a class III peroxidase and the mitochondrial protein TSPO in oxidative burst upon treatment of moss plants with a fungal elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012;25(3):363–371. DOI: 10.1094/MPMI-10-11-0265.
27. Overdijk EJ, Keijzer JDE, de Groot D, Schoina C, Bouwmeester K, Ketelaar T, et al. Interaction between the moss *Physcomitrella patens* and *Phytophthora*: a novel pathosystem for live-cell imaging of subcellular defense. *Journal of Microscopy*. 2016;263(2):171–180. DOI: 10.1111/jmi.12395.
28. Lawton M, Saidasan H. Pathogenesis in mosses. In: Knight C, Perroud P-F, Cove D (eds.) *The Moss Physcomitrella patens*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. p.298–339. (Annual Plant Reviews; volume 36.) DOI: 10.1002/9781444316070.ch12.

29. Koselski M, Trebacz K, Dziubinska H. Cation-permeable vacuolar ion channels in the moss *Physcomitrella patens*: a patch-clamp study. *Planta*. 2013;238(2):357–367. DOI: 10.1007/s00425-013-1902-4.
30. Finka A, Cuendet AFH, Maathuis FJM, Saidi Y, Goloubinoff P. Plasma Membrane Cyclic Nucleotide Gated Calcium Channels Control Land Plant Thermal Sensing and Acquired Thermotolerance. *The Plant Cell*. 2012;24:3333–3348. DOI: 10.1105/tpc.112.095844.
31. Koselski M, Dziubinska H, Seta-Koselska A, Trebacz K. A nitrate-permeable ion channel in the tonoplast of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*. 2015;241(5):1207–1219. DOI: 10.1007/s00425-015-2250-3. PMID: 19812738.
32. Simonsen HT, Drew DP, Lunde C. Perspectives on Using *Physcomitrella patens* as an Alternative Production Platform for Thapsigargin and Other Terpenoid Drug Candidates. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 2009;3:1–6.
33. Rosales-Mendoza S, Orellana-Escobedo L, Romero-Maldonado A, Decker EL, Reski R. The potential of a as a platform for the production of plant-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2014;13(2):203–212. DOI: 10.1586/14760584.2014.872987.
34. Michelfelder S, Parsons J, Bohlender LL, Hoernstein SNW, Niederkrüger H, Busch A, et al. Moss-Produced, Glycosylation-Optimized Human Factor H for Therapeutic Application in Complement Disorders. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(5):1462–1474. DOI: 10.1681/ASN.2015070745.
35. Khairul Ikram NKB, Beyraghdar Kashkooli A, Peramuna AV, van der Krol AR, Bouwmeester H, Simonsen HT. Stable Production of the Antimalarial Drug Artemisinin in the Moss *Physcomitrella patens*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2017;5:47. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00047.
36. Bascom CSJr, Winship LJ, Bezanilla M. Simultaneous imaging and functional studies reveal a tight correlation between calcium and actin networks. *Plant biology*. 2018;115(12):1–10. DOI: 10.1073/pnas.1711037115.
37. Yokota Y, Sakamoto AN. The Moss *Physcomitrella patens* is Hyperresistant to DNA Double-Strand Breaks Induced by γ -Irradiation. *Genes*. 2018;9(2):1–11. DOI: 10.3390/genes9020076.
38. Yin X, Wang L, Liu Y, Jiang T, Gao J. Characterization of Arsenic Biotransformation by a Typical Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017;98(2):251–256. DOI: 10.1007/s00128-016-1997-y.
39. Nishiyama T, Fujita T, Shin-I T, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, et al. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(13):8007–8012. DOI: 10.1073/pnas.0932694100.
40. Sugiura C, Kobayashi Y, Aoki S, Sugita C, Sugita M. Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of rpoA from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(18):5324–5331. DOI: 10.1093/nar/gkg726.
41. Cuming AC, Cho SH, Kamisugi Y, Graham H, Quatrano RS. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*. 2007;176(2):275–287. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02187.x.
42. Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M, Wada M. Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*. 2002;14(2):373–386. DOI: 10.1105/tpc.010388.
43. Hohe A, Rensing SA, Mildner M, Lang D, Reski R. Day length and temperature strongly influence sexual reproduction and expression of a novel MADS-box gene in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant biology*. 2002;4:595–602. DOI: 10.1055/s-2002-35440.
44. Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T. *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(24):11128–11133. DOI: 10.1073/pnas.1002873107.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

УДК 581.143.6

ВЛИЯНИЕ LED-ОСВЕЩЕНИЯ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА НА РОСТ И БИОСИНТЕЗ АЛКАЛОИДОВ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ *VINCA MINOR*

О. В. МОЛЧАН¹⁾, В. М. ЮРИН²⁾

¹⁾Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Показаны изменения ростовых параметров, содержания хлорофилла, каталазной и пероксидазной активности, а также активности триптофан декарбоксилазы, ключевого фермента биосинтеза фармакологически ценных индольных алкалоидов, и эндогенного уровня протоалкалоида триптамина в каллусе *Vinca minor* под действием света различного спектрального состава. Установлена максимальная стимуляция LED-освещением с преобладанием зеленого света в спектре накопления сухого вещества и активности триптофан декарбоксилазы.

Ключевые слова: каллус; каталаза; индекс роста; пероксидаза; триптофан декарбоксилаза; триптами; LED-освещение; *Vinca minor*.

EFFECT OF LED-LIGHTING WITH VARIOUS SPECTRAL COMPOSITION ON THE GROWTH AND ALKALOIDS BIOSYNTHESIS IN *VINCA MINOR* CALLUS CULTURES

O. V. MOLCHAN^a, V. M. YURIN^b

^aV. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: O. V. Molchan (olga_molchan@mail.ru)

Changes in growth parameters, the chlorophyll content, catalase and peroxidase activity, as well as the activity of tryptophan decarboxylase, a key enzyme of pharmacologically valuable indole alkaloid biosynthesis and endogenous level of protoalkaloid tryptamine under the influence of light with different spectral composition are shown. Maximal stimulation by LED-illumination with a predominance of green light in the accumulation of dry matter and activity of tryptophan decarboxylase are established.

Key words: callus; catalase; growth index; peroxidase; tryptophan decarboxylase; tryptamine; LED lighting; *Vinca minor*.

Образец цитирования:

Молчан ОВ, Юрин ВМ. Влияние LED-освещения различного спектрального состава на рост и биосинтез алкалоидов в каллусных культурах *Vinca minor*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018; 2:48–56.

For citation:

Molchan OV, Yurin VM. Effect of LED-lighting with various spectral composition on the growth and alkaloids biosynthesis in *Vinca minor* callus cultures. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:48–56 (in Russ.).

Авторы:

Ольга Викторовна Молчан – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией водного обмена и фотосинтеза растений.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Olga V. Molchan, PhD (biology); head of the laboratory of water exchange and photosynthesis of plants.

olga_molchan@mail.ru

Vladimir M. Yurin, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

yurin@bsu.by

Введение

Использование светоизлучающих диодов (LED) является инновационным подходом, имеющим большие перспективы в создании и оптимизации систем освещения для точного управления физиологическими процессами растений и продукцией ценных вторичных метаболитов *in vivo* и *in vitro*. Свет – один из наиболее важных факторов окружающей среды, который используется растениями и как уникальный источник энергии в процессах фотосинтеза, и как источник информации, оказывающий непосредственное воздействие на рост и развитие. Благодаря фоторецепторам растения способны оценивать длину волны, интенсивность, направление, а также продолжительность действия света и трансформировать полученную информацию в системах фотоморфогенетической регуляции [1]. Поэтому варьирование и оптимизация параметров освещенности могут позволить контролировать рост и развитие растений, культивируемых *in vitro*, баланс между скоростью роста, накоплением биомассы, первичных и вторичных метаболитов в клеточных культурах [1; 2].

Светодиоды могут излучать свет практически любой длины волны в диапазоне физиологически активной радиации. При этом узкий диапазон длин волн излучения позволяет создавать, используя определенные LED-композиции, спектры, оптимальные для конкретного вида и типа культивируемых *in vitro* клеток, а также регулировать плотность потока фотонов (ППФ) и продолжительность излучения в пределах каждой спектральной составляющей на определенной фазе роста с учетом целей и задач культивирования. Следует также отметить, что изучение регуляции ростовых процессов и биосинтеза фармакологически ценных вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей с помощью различных режимов LED-излучения является одним из перспективных направлений исследований.

Барвинок малый (*Vinca minor* L.) – фармакологически ценное растение, синтезирующее более 45 терпеновых индольных алкалоидов (ТИА) [3–5]. Лекарственные средства, содержащие сумму ТИА *V. minor*, применяют при артериальной гипертензии, цереброваскулярной недостаточности, неврогенной тахикардии, головокружении, снижении памяти и способности к концентрации внимания у пациентов пожилого возраста, атеросклерозе сосудов головного мозга, диабетической ангиопатии, последствиях нарушения мозгового кровообращения и т. д. [6; 7]. Для *V. minor* характерен европейско-средиземноморский тип ареала, а на территории Беларуси растение является интродуцентом и в качестве лекарственного сырья не заготавливается [8]. Поэтому альтернативным источником ТИА барвинка малого могут служить клетки, культивируемые *in vitro*. Однако применение технологии *in vitro* часто не позволяет получить достаточный уровень биосинтеза фармакологически активных метаболитов, необходимый для экономически целесообразного использования в производстве [9–11]. Дедифференцированные клетки накапливают, как правило, незначительное по сравнению с интактным растением количество вторичных метаболитов. Поэтому на первом плане – разработка технологий культивирования клеток и тканей растений, обеспечивающих их максимальную продуктивность. Одним из наиболее очевидных современных подходов для решения этой проблемы является использование LED-освещения [9–12].

Число проведенных в мире к настоящему времени исследований, посвященных влиянию света различного спектрального состава на культуры *in vitro*, крайне ограничено. В основном опубликованы результаты сравнительного анализа ростовых и биосинтетических процессов в клетках гетеротрофных и фотомиксотрофных (на белом свете с использованием люминесцентных ламп) культур [9–12]. При этом разными группами авторов получены весьма противоречивые данные при исследовании влияния света на синтез ТИА. Так, показано, что свет стимулирует синтез отдельных алкалоидов, например серпентина в каллусной культуре *C. roseus* [12]. Однако другими исследователями установлено, что в гетеротрофной культуре *C. roseus* биосинтез серпентина интенсивнее, чем в фотомиксотрофной [13]. Согласно результатам исследований еще одной группы длительная экспозиция на свете суспензионной культуры *C. roseus* приводит к существенному повышению содержания как серпентина, так и аймалицина [14]. В других работах определено, что содержание аймалицина в каллусной культуре под воздействием освещения, наоборот, снижается [15], а облучение каллусной культуры светом в синей (450 нм) или красной (670 нм) областях спектра не влияет на биосинтез аймалицина и серпентина [16].

Исследований воздействия LED-освещения различного спектрального состава на рост и биосинтез алкалоидов в каллусных культурах *V. minor* не проводилось вовсе.

Цель данной работы – оценка влияния различных режимов LED-освещения на ростовые и биохимические параметры каллуса *Vinca minor*, в том числе на активность триптофан декарбоксилазы (ТДК), ключевого фермента биосинтеза фармакологически ценных ТИА, и на эндогенный уровень протоалкалоида триптамина.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась каллусная культура *Vinca minor* L. Гетеротрофный каллус выращивали в темноте на агаризованной среде Мурасиге – Скуга [17], содержащей 30 г/л сахарозы, по 1 мг/л нафтилуксусной кислоты и кинетина, 8 г/л агара. Пересадку осуществляли каждые 30 сут. Фотомиксотрофный каллус – на среде того же состава при люминесцентном освещении (контроль) и LED-освещении различного спектрального состава и интенсивности с фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота).

Были использованы четыре специализированные системы LED-освещения (производства УНПП «Актагор-пром»). Для организации освещения применяли излучение всех длин волн видимого света (400–750 нм) с варьируемым соотношением квантов синего, зеленого, красного и дальнего красного спектральных диапазонов. Спектральные характеристики LED-освещения (варианты LED1, LED2, LED3, LED4) представлены на рис. 1. ППФ при всех вариантах освещения составлял в среднем $50\text{--}55 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Спектральные характеристики светильников анализировали с использованием спектрорадиометра CAS140CT (Германия).

Для характеристики ростовых процессов рассчитывали индекс роста по формуле

$$I = \frac{m_t - m_0}{m_0},$$

где m_t – масса каллуса в конце цикла выращивания (30-е сутки); m_0 – начальная масса каллуса, г.

При определении сухой массы каллусную ткань сушили при 50 °С.

Для расчета активности ферментов использовали каллус в лог-фазе (20 сут) ростового цикла. Активность ТДК и содержание триптамина находили по методу Сангван с соавторами [18]. Триптамин детектировали с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse (США) при длине волны возбуждения $\lambda = 280$ нм и эмиссии 340 нм. Содержание эндогенного триптамина определяли по соответствующей калибровочной кривой.

Каталазную и пероксидазную активности определяли спектрофотометрически с небольшими изменениями согласно [19; 20] с использованием спектрофотометра СФ-2000 (Россия).

Эксперименты проводили в 4–5-кратной повторности. Для статистического анализа полученных результатов применяли стандартные методы вариационной статистики [21]. Данные на гистограммах и в таблицах представлены как среднее арифметическое и ошибка средней величины. Различия между средними показателями оценивали при уровне значимости p не более 0,05.

Результаты и их обсуждение

Высокая фотосинтетическая эффективность света в сочетании с высоким КПД, характерная для красных светодиодов, стимулировала многих исследователей использовать именно эти светодиоды для создания оптимального освещения [22]. Однако во многих случаях длительное воздействие только красного света приводило к снижению фотосинтетической активности. Более эффективным оказалось сочетание красного и синего диапазонов, такой подход существенно увеличивал квантовый выход фотосинтеза [22]. Поэтому продолжительное время считали, что для выращивания растений необходим и достаточен свет, получаемый комбинированием монохромных (красных и синих) LED-источников излучения, соответствующих максимумам поглощения хлорофилла, и большая часть работ была посвящена изучению влияния монохроматического фотосинтетически значимого освещения в красной или синей областях спектра либо их композициям [22]. Однако рост и развитие растений обеспечиваются совокупностью не только фотосинтетических, но и многих других светозависимых, фотоморфогенетических процессов, регулируемых светом различных спектральных диапазонов, а также соотношением между ними [1; 2; 22].

В настоящей работе использовали LED-источники освещения, излучающие свет всех спектральных диапазонов видимого света (400–800 нм) с различным соотношением между ними (см. рис. 1). Анализ спектральных характеристик данных LED-излучателей позволил выявить некоторые закономерности (табл. 1). Уровень ППФ в диапазоне 400–499 нм (фиолетово-синий) был приблизительно одинаковым для люминесцентного освещения (вариант ЛЛ) и всех вариантов LED-освещения и составлял 21–26 % от всего светового потока, а в зелено-желтой области (500–599 нм) – 17; 9; 11; 18 и 45 % для вариантов ЛЛ, LED1, LED2, LED3 и LED4 соответственно. В оранжево-красном диапазоне спектра (600–699 нм) уровень ППФ был достаточно высоким: 52; 65; 60; 50 и 30 % для вариантов ЛЛ, LED1, LED2, LED3 и LED4 соответственно. Дальнего красного света (700–750 нм) в спектрах всех вариантов было в среднем 2–3 %. Наиболее близким к контрольному люминесцентному освещению по спектральным характеристикам был вариант LED3.

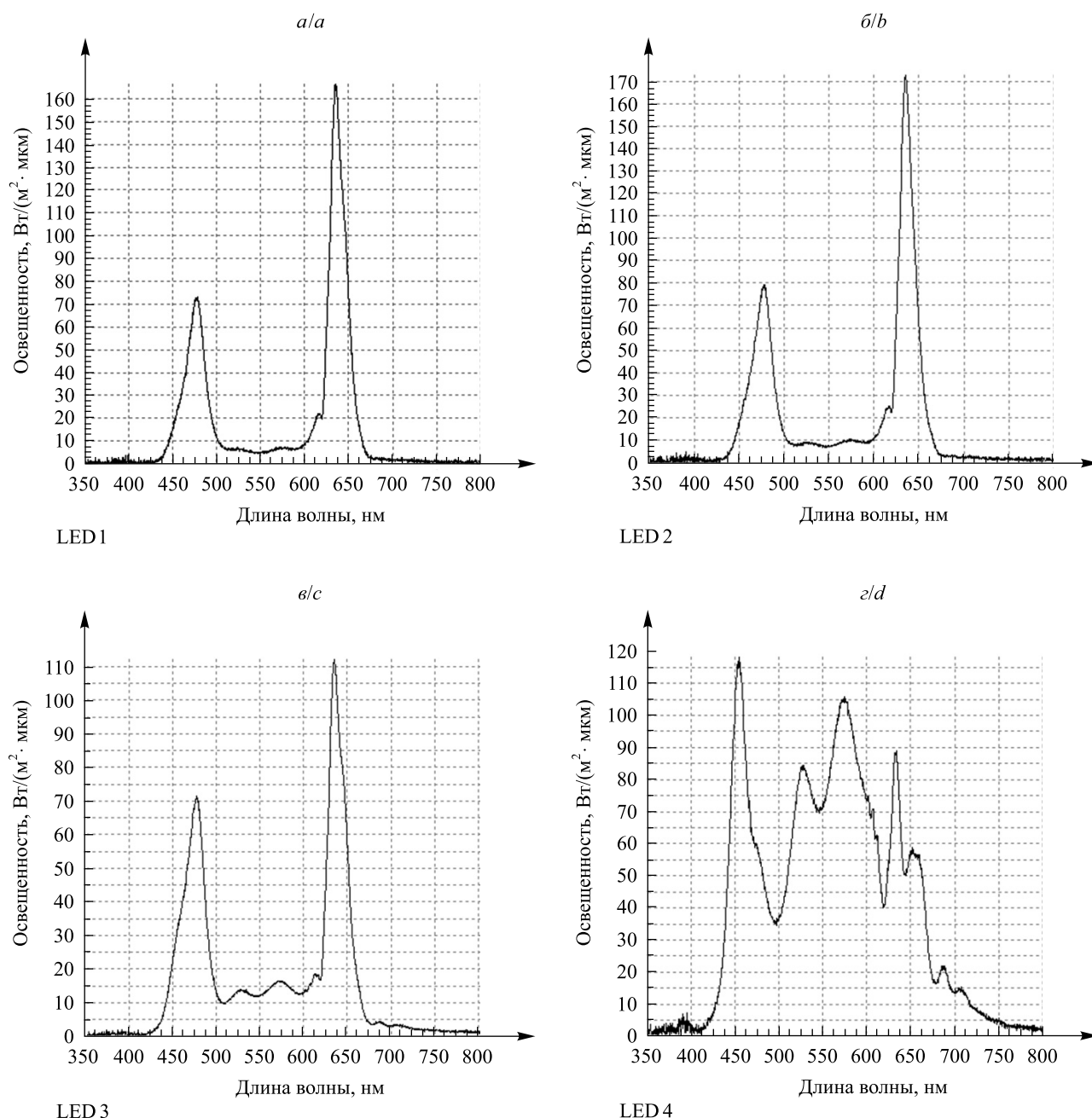


Рис. 1. Спектры специализированных систем LED-освещения для культивирования каллусных тканей

Fig. 1. Spectra of specialized LED lighting systems for the cultivation of callus tissues

Одной из наиболее существенных характеристик культур *in vitro* является интенсивность ростовых процессов. Свет – важный физический фактор (условия культивирования клеточных культур), варьирование и оптимизация параметров которого может позволить контролировать рост, а также баланс между ростовыми и биосинтетическими процессами [9–11]. Индекс роста гетеротрофной каллусной культуры часто выше, чем индекс роста фотомиксотрофного каллуса. При этом на свету культуры обычно накапливают больше сухого вещества.

В нашем исследовании оценка индекса роста каллусных тканей *V. minor* к концу ростового цикла (30-е сутки) показала, что наиболее интенсивным накоплением сырой биомассы отличается гетеротрофный каллус, а также фотомиксотрофный при освещении LED 1 и LED 2 с наименьшим уровнем ППФ в сине-зеленой области (400–599 нм) (табл. 2). Для данных вариантов освещения (особенно для LED 1) было характерно превалирование красного света в спектре (600...699 нм – 60...63 %) по сравнению с другими спектральными диапазонами. Так, в варианте освещения LED 1 соотношения К/С, К/ДК, К/З, С/З (см. табл. 1) были максимальными среди используемых вариантов освещения и составляли 2,5; 40,8; 7,2 и 2,9 соответственно.

Таблица 1

Спектральные характеристики специализированных систем
LED-освещения для культивирования каллусных тканей

Table 1

Spectral characteristics of specialized
LED lighting systems for the cultivation of callus tissues

Вариант	ППФ, %				К/С	К/ДК	К/З	С/З
	400–499 нм	500–599 нм	600–699 нм	700–799 нм				
ЛЛ	26,50	16,80	51,61	2,92	1,95	17,8	3,1	1,6
LED 1	25,93	8,80	63,71	1,56	2,5	40,8	7,2	2,9
LED 2	26,77	11,12	59,90	2,20	2,2	27,2	5,4	2,4
LED 3	28,95	18,43	49,84	2,78	1,7	17,9	2,7	1,6
LED 4	21,35	44,92	30,12	3,61	1,4	8,3	0,7	0,5

Примечание. К – красный свет (640–680 нм); С – синий свет (300–480 нм); ДК – дальний красный свет (700–750 нм); З – зеленый свет (510–565 нм).

Таблица 2

Индекс роста, содержание сухого вещества
и хлорофилла каллусных тканей *V. minor* при различных вариантах освещения

Table 2

Growth index, dry matter and chlorophyll content
of *V. minor* callus tissues under different lighting options

Показатели	Гетеротрофный каллус (темнота)	Фотомиксотрофный каллус				
		ЛЛ	LED 1	LED 2	LED 3	LED 4
Индекс роста, отн. ед.	6,59 ± 0,52	4,54 ± 0,44	8,59 ± 0,56	7,63 ± 0,51	5,59 ± 0,37	5,89 ± 0,62
Содержание сухого вещества, %	4,35 ± 0,21	6,45 ± 0,62	4,22 ± 0,25	4,45 ± 0,31	6,45 ± 0,15	7,12 ± 0,56
Содержание хлорофилла, мкг/г _{сыр. в-ва}	–	4,45 ± 0,32	4,92 ± 0,25	4,95 ± 0,31	4,15 ± 0,15	3,22 ± 0,26

Накопление сухого вещества каллусными тканями варьировало в среднем от 4,0 до 7,5 % и было максимальным при люминесцентном освещении и освещении вариантов LED 3 и LED 4. Важно отметить, что именно эти варианты характеризовались максимальной интенсивностью света в сине-зеленом диапазоне длин волн, а соотношения К/З и С/З в их спектре были меньше единицы (см. табл. 1). Самый высокий уровень ксероморфности был характерен для каллусов при освещении варианта LED 4 с максимальным содержанием зеленого света (см. табл. 2).

Известно, что интенсивность ростовых процессов во многом зависит от деления и растяжения клеток. В ряде работ показано, что зеленый свет (550 нм), нарушая митотическую фазу клеточного цикла, уменьшает растяжение клеток растений [23; 24]. Таким образом, может формироваться ткань с мелкими клетками и высоким уровнем ксероморфности, что, вероятно, и происходило при освещении каллуса *V. minor* LED-излучателями варианта LED 4. С другой стороны, биологическая роль зеленого света обусловлена его необходимостью для жизнедеятельности затененных нижних ярусов фитоценоза, нижних листьев кроны растений и нижних слоев клеток листа, куда проникает свет, обедненный красным и синим и обогащенный зеленым и дальним красным светом [25; 26]. Для *V. minor* характерно существование в плотных наземных фитоценозах. Возможно, именно этим фактом обусловлены достаточно высокие эффекты освещения варианта LED 4 на уровень ростовых процессов и накопления сухого вещества каллусов *V. minor*.

Образование хлорофилла в каллусах было в среднем одинаковым при люминесцентном и светодиодном (LED 1–3) вариантах освещения (см. табл. 2). При всех этих вариантах каллусы накапливали 4–5 мкг/г_{сыр. в-ва} хлорофилла. Вероятно, уровень образования хлорофилла при данных вариантах освещения определялся в большей степени суммарной интенсивностью света, чем его спектральным составом. Несколько ниже ((3,22 ± 0,26) мкг/г_{сыр. в-ва}) было содержание хлорофилла при варианте освещения LED 4 с повышенным содержанием зеленого света в спектре. Нужно отметить, что публикации об

участии зеленого света в регуляции ростовых и биосинтетических процессов каллусных культур практически отсутствуют. Незначительное число работ проведено с использованием проростков и растений и показано, что зеленый свет, с одной стороны, ингибирует рост при длительном культивировании растений, с другой – на начальных этапах онтогенеза стимулирует дезиоляцию проростков [23–25]. Также было показано, что на ранних фазах морфогенеза сочетание желтого и зеленого света ускоряло формирование мембранной системы пластид, а на более поздних – замедляло переход к гранальной системе хлоропласта [26]. Также при длительной адаптации к зеленому свету у большого числа видов растений уменьшался уровень пигментов в единице площади листа, но увеличивался в единичном хлоропласте [27].

Характер активности антиоксидантных ферментов – каталазы и пероксидазы – в каллусных тканях *V. minor* при различных вариантах освещения менялся в зависимости от интенсивности света в красном и сине-зеленом диапазонах (рис. 2). При уменьшении в спектре освещения доли красного света, увеличении доли зеленого и, таким образом, снижении соотношений К/С, К/З, К/ДК и С/З в исследуемых каллусах возрастала каталазная активность (см. рис. 2, а). Для пероксидазной активности зависимость от спектрального состава освещения была не столь выражена (см. рис. 2, б). В большей степени активность пероксидазы соответствовала содержанию сухого вещества (см. рис. 2, б, табл. 2). Известно, что, с одной стороны, в стрессовых условиях в растениях увеличивается активность каталазы и пероксидазы, так как последние являются ферментами антиоксидантной системы, с другой – указанная активность часто коррелирует с интенсивностью фотосинтетических процессов, поскольку активация фотосинтеза связана с образованием активных форм кислорода [28].

Полученные данные свидетельствуют о том, что зеленый свет не лимитирует фотосинтетическую активность и регулирует ростовые процессы и, таким образом, может быть использован в спектральном составе LED-источников освещения для культивирования каллусной ткани *V. minor*. Однако главный вопрос заключался в следующем: насколько интенсивны процессы биосинтеза ТИА, фармакологически значимых вторичных метаболитов *V. minor*, в каллусной ткани при использовании LED-источников освещения. Для ответа на этот вопрос были определены активность ТДК, ключевого фермента биосинтеза ТИА, и уровень накопления триптамина (рис. 3).

Биосинтез продуктов вторичного метаболизма, как правило, наиболее интенсивен в определенной стадии роста клеточной культуры, для каллуса *V. minor* – к концу лог-фазы ростового цикла [29]. Поэтому активность ТДК и содержание эндогенного триптамина в каллусной ткани определяли именно на этом этапе ростового цикла – на 20-е сутки культивирования. Наблюдаемая стимуляция светом активности ТДК (см. рис. 3, а) позволяет предположить участие фермента в реакциях и вторичного, и первичного метаболизма. ТДК может являться важным элементом первичного метаболизма, регулируя шикиматный путь биосинтеза и катаболизма L-триптофана. В данной работе максимальная активность фермента отмечена при освещении варианта LED4. При других вариантах освещения уровень ТДК достоверно превышал контрольное значение (активность ТДК в гетеротрофном каллусе), но отличия между вариантами ЛЛ и LED 1–3 отсутствовали.

В то же время было показано, что, хотя освещение и приводило к стимуляции накопления эндогенного триптамина, выраженного эффекта какого-либо из вариантов не было отмечено. Кроме того, эндогенный уровень содержания триптамина не соответствовал активности ТДК (см. рис. 3), т. е. при

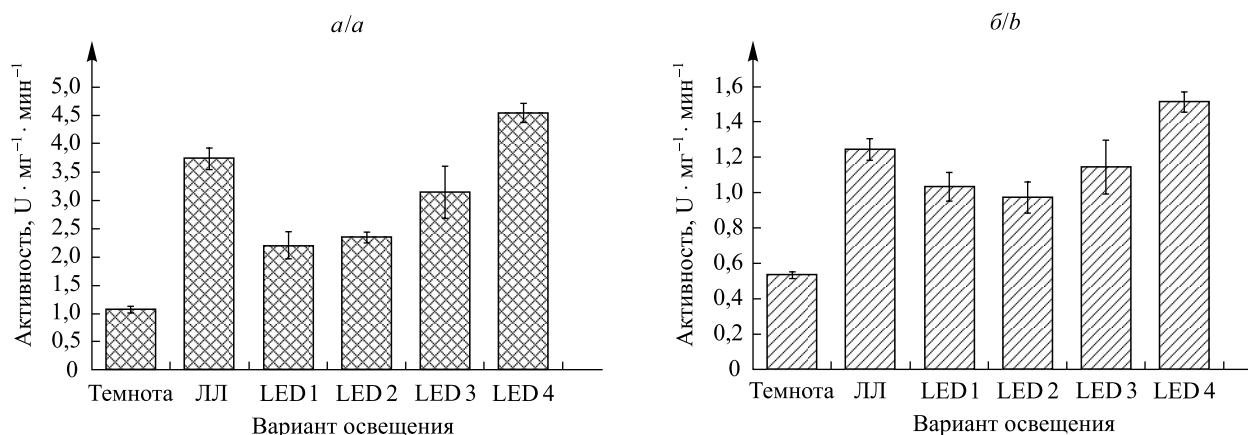


Рис. 2. Активность каталазы (а) и пероксидазы (б) в каллусных тканях *V. minor* при различных вариантах освещения

Fig. 2. Catalase (а) and peroxidase (б) activity in *V. minor* callus tissues under different illumination options

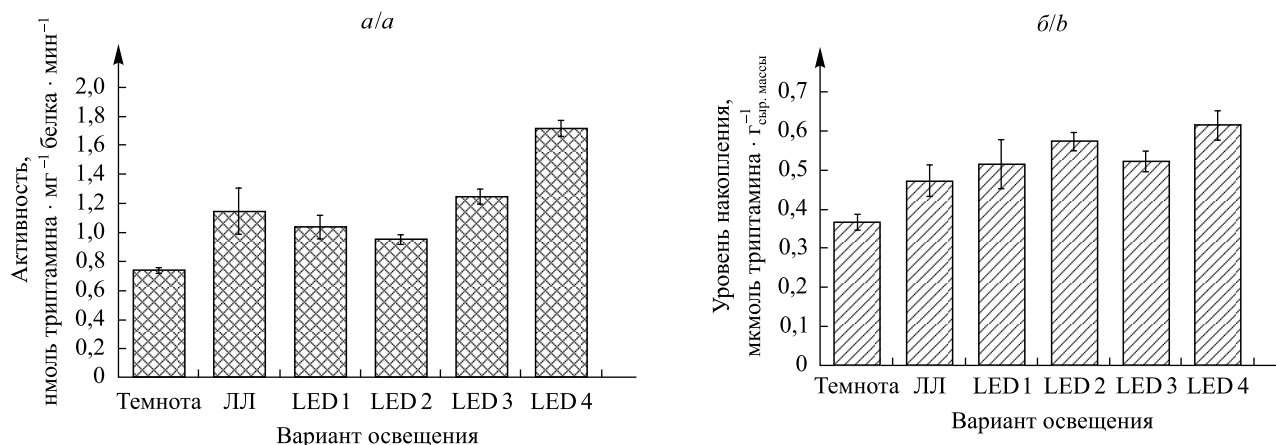


Рис. 3. Активность ТДК (а) и уровень накопления триптамина (б) в каллусных тканях *V. minor* при различных вариантах освещения

Fig. 3. TDC activity (a) and the level of tryptamine accumulation (b) in *V. minor* callus tissues under different illumination options

максимальной активности ТДК (под влиянием варианта освещения LED4 с повышенным содержанием зеленого света в спектре) повышения уровня эндогенного триптамина по сравнению с другими вариантами освещения не наблюдалось. Не исключено, что это обусловлено включением триптамина в дальнейшую цепочку биосинтеза ТИА. Хорошо известно, что свет контролирует развитие хлоропластов, и, поскольку алкалоиды барвинка малого синтезируются в хлоропластсодержащих тканях, становится очевидной функциональная роль зеленого света в биосинтезе данных соединений в каллусных тканях.

Таким образом, исследование влияния спектрального состава LED-излучения на ростовые и биосинтетические процессы каллусной культуры *V. minor* показало, что наиболее интенсивными процессами накопления сырой биомассы отличаются каллусы при освещении с преобладанием красного света в спектре. Биосинтез и накопление хлорофилла в большей степени зависели от уровня ППФ, чем от спектрального состава используемых источников света. Было также установлено выраженное стимулирующее влияние зеленого света на образование сухого вещества и активность ТДК в каллусных тканях. Можно заключить, что зеленый свет представляется важным экзогенным фактором, регулирующим биосинтез ТИА барвинка малого, и, таким образом, ключевым компонентом спектрального состава источников света, используемых для организации LED-освещения при культивировании *V. minor* в культуре *in vitro*.

Библиографические ссылки

1. Nagatani A. Photomorphogenesis. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 2nd edn. 2017;1:442–447.
2. Demotes-Mainard S. Plant responses to red and far-red lights, application in horticulture. *Environmental and experimental Botany*. 2016;121:4–21.
3. Opke W. Alkaloids from *Vinca minor*. *Tetrahedron Letters*. 1968;58:6065–6066.
4. Kostka K. Trials of isolating alkaloids from the domestic species *Vinca minor* L. *Dissertationes Pharm.* 1961;13:37–48.
5. Победимова ЕГ. Сем. Аросупацеве. В: Шишкина БК, Боброва ЕГ (ред.) *Флора СССР. Том 18*. Москва: АН СССР; 1952. с.646–652.
6. Вышковский ГА. *Регистр лекарственных средств России*. 11-е изд. Москва: РЛС; 2004.
7. *Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России*. Москва: АстраФармСервис; 2001.
8. Джус МА, Молчан ОВ, Кухарева ЛВ, Спиридович ЕВ, Юрин ВМ. Особенности распространения и эколого-ценотическая характеристика видов рода *Vinca* L. во флоре Беларуси. *Украинский ботанический журнал*. 2009;66(6):783–793.
9. Юрин ВМ, Дитченко ТИ, Молчан ОВ, Шапчиц МП, Ромашко СН, Булатова АА и др. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2009;4(2):168–182.
10. Verpoorte R, Contin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*. 2002;1(1):13–25. DOI: 10.1023/A:1015871916833.
11. Rao RS, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2002;20(2):101–153. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
12. Loyola-Vargas VM, Méndez-Zeal M, Monforte-González M, de Lourdes Miranda-Ham M. Serpentine accumulation during greening in normal and tumor tissues of *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology*. 1992;140(2):213–217. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80937-5.
13. Pietrosiuk A, Furmanowa M, Łata B. *Catharanthus roseus*: micropropagation and *in vitro* techniques. *Phytochemistry Reviews*. 2007;6(2–3):459–473. DOI: 10.1007/s11101-006-9049-6.

14. Zhao J, Zhu W-H, Hu Q. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. *Plant Growth Regulation*. 2001;33(1):43–49. DOI: 10.1023/A:1010722925013.
15. Vazquez-Flota FA, de Luca V. Developmental and light regulation of desacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiology*. 1998;117(4):1351–1361. DOI: 10.1104/pp.117.4.1351.
16. Iwase A, Aoyagi H, Ohme-Takagi M, Tanaka H. Development of a novel system for producing ajmalicine and serpentine using direct culture of leaves in *Catharanthus roseus* intact plant. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;99(3):208–215. DOI: 10.1263/jbb.99.208.
17. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(13):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
18. Sangwan RS, Mishra S, Kumar S. Direct fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay of L-tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* leaf. *Analytical biochemistry*. 1998;255(1):39–46. DOI: 10.1006/abio.1997.2377.
19. Kumar KB, Khan PA. Peroxidase and polyphenol oxidase in excised ragi (*Eleusine coracana* cv.PR 202) leaves during senescence. *Indian Journal of Experimental Botany*. 1982;20:412–416.
20. Chandlee JM, Scandalios JG. Analysis of variants affecting the catalase development program in maize scutellum. *Theoretical and Applied Genetics*. 1984;69(1):71–77. DOI: 10.1007/BF00262543.
21. Рокицкий ПФ. Введение в статистическую генетику. Минск: Вышэйшая школа; 1974.
22. Xu Y, Chang Y, Chen G, Lin H. The research on LED supplementary lighting system for plants Optik. *International Journal for Light and Electron Optics*. 2016;127(18):7193–7201. DOI: 10.1016/j.ijleo.2016.05.056.
23. Головацкая ИФ, Карначук РА. Роль зеленого света в жизнедеятельности растений. *Физиология растений*. 2015;62(6):776–791. DOI: 10.7868/S0015330315060081.
24. Klein RM. Reversible effects of green and orange-red radiation on plant cell elongation. *Physiologia Plantarum*. 1979;63(1):114–116. DOI: 10.1104/pp.63.1.114.
25. Terashima I, Fujita T, Inoue T, Chow WS, Oguchi R. Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiology*. 2009;50:684–697. DOI: 10.1093/pcp/pcp034.
26. Шахов АА. Фотознергетика растений и урожай. Москва: Наука; 1993.
27. Карначук РА, Головацкая ИФ. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава. *Физиология растений*. 1998;45(6):925–934.
28. Dietz KJ, Turkan I, Krieger-Liszka A. Redox- and Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling into and out of the Photosynthesizing Chloroplast. *Plant Physiology*. 2016;171(3):1541–1550. DOI: 10.1104/pp.16.00375.
29. Молчан ОВ, Юрин ВМ. Получение мутантных каллусных линий *Vinca minor* L. с повышенными уровнями активности триптофандекарбоксилазы и содержания триптамина. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2016;11(2):148–155.

References

1. Nagatani A. Photomorphogenesis. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 2nd edn. 2017;1:442–447.
2. Demotes-Mainard S. Plant responses to red and far-red lights, application in horticulture. *Environmental and experimental Botany*. 2016;121:4–21.
3. Opke W. Alkaloids from *Vinca minor*. *Tetrahedron Letters*. 1968;58:6065–6066.
4. Kostka K. Trials of isolating alkaloids from the domestic species *Vinca minor* L. *Dissertationes Pharm*. 1961;13:37–48.
5. Pobedimova EG. Sem. Apocynaceae. In: Shishkina BK, Bobrova EG (eds.) *Flora SSSR. Volume 18*. Moscow: Academy of Sciences of the USSR; 1952. p.646–652 (in Russ.).
6. Vyshkovskii GA. *Registr lekarstvennykh sredstv Rossii*. 11th edn. Moscow: RLS; 2004 (in Russ.).
7. *Spravochnik Vidal'. Lekarstvennye preparaty v Rossii*. Moscow: AstraFarmServis; 2001.
8. Dzhus MA, Molchan OV, Kukhareva LV, Spiridovich EV, Yurin VM. Osobennosti rasprostraneniya i ekologo-tsenoticheskaya kharakteristika vidov roda *Vinca* L. vo flore Belarusi. *Ukrainskii botanicheskii zhurnal*. 2009;66(6):783–793 (in Russ.).
9. Yurin VM, Ditchenko TI, Molchan OV, Shapchits MP, Romashko SN, Bulatova AA, et al. Kul'tura rastitel'nykh kletok i tkanei: tekhnologiya polucheniya, raznoobrazie farmakologicheskii aktivnykh metabolitov i priemy regulyatsii ikh sinteza. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem*. 2009;4(2):168–182 (in Russ.).
10. Verpoorte R, Contin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*. 2002;1(1):13–25. DOI: 10.1023/A:1015871916833.
11. Rao RS, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2002;20(2):101–153. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
12. Loyola-Vargas VM, Méndez-Zeel M, Monforte-González M, de Lourdes Miranda-Ham M. Serpentine accumulation during greening in normal and tumor tissues of *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology*. 1992;140(2):213–217. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80937-5.
13. Pietrosiuk A, Furmanowa M, Łata B. *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews*. 2007;6(2–3):459–473. DOI: 10.1007/s11101-006-9049-6.
14. Zhao J, Zhu W-H, Hu Q. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. *Plant Growth Regulation*. 2001;33(1):43–49. DOI: 10.1023/A:1010722925013.
15. Vazquez-Flota FA, de Luca V. Developmental and light regulation of desacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiology*. 1998;117(4):1351–1361. DOI: 10.1104/pp.117.4.1351.
16. Iwase A, Aoyagi H, Ohme-Takagi M, Tanaka H. Development of a novel system for producing ajmalicine and serpentine using direct culture of leaves in *Catharanthus roseus* intact plant. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;99(3):208–215. DOI: 10.1263/jbb.99.208.
17. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(13):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

18. Sangwan RS, Mishra S, Kumar S. Direct fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay of L-tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* leaf. *Analytical biochemistry*. 1998;255(1):39–46. DOI: 10.1006/abio.1997.2377.
19. Kumar KB, Khan PA. Peroxidase and polyphenol oxidase in excised ragi (*Eleusine coracana* cv.PR 202) leaves during senescence. *Indian Journal of Experimental Botany*. 1982;20:412–416.
20. Chandlee JM, Scandalios JG. Analysis of variants affecting the catalase development program in maize scutellum. *Theoretical and Applied Genetics*. 1984;69(1):71–77. DOI: 10.1007/BF00262543.
21. Rokitskii PF. *Vvedenie v statisticheskuyu genetiku*. Minsk: Vysheishaya shkola; 1974 (in Russ.).
22. Xu Y, Chang Y, Chen G, Lin H. The research on LED supplementary lighting system for plants Optik. *International Journal for Light and Electron Optics*. 2016;127(18):7193–7201. DOI: 10.1016/j.ijleo.2016.05.056.
23. Golovatskaya IF, Karnachuk RA. Role of green light in physiological activity of plants. *Fiziologiya rastenii*. 2015;62(6):776–791. DOI: 10.7868/S0015330315060081 (in Russ.).
24. Klein RM. Reversible effects of green and orange-red radiation on plant cell elongation. *Physiologia Plantarum*. 1979;63(1):114–116. DOI: 10.1104/pp.63.1.114.
25. Terashima I, Fujita T, Inoue T, Chow WS, Oguchi R. Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiology*. 2009;50:684–697. DOI: 10.1093/pcp/pcp034.
26. Shakhov AA. *Fotoenergetika rastenii i urozhai*. Moscow: Nauka; 1993 (in Russ.).
27. Karnachuk RA, Golovatskaya IF. Gormonal'nyi status, rost i fotosintez rastenii, vyrashchennykh na svetu raznogo spektral'nogo sostava. *Fiziologiya rastenii*. 1998;45(6):925–934 (in Russ.).
28. Dietz KJ, Turkan I, Krieger-Liszkay A. Redox- and Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling into and out of the Photosynthesizing Chloroplast. *Plant Physiology*. 2016;171(3):1541–1550. DOI: 10.1104/pp.16.00375.
29. Molchan OV, Yurin VM. Poluchenie mutantnykh kallusnykh linii *Vinca minor* L. s povyshennymi urovnymi aktivnosti triptofandekarboksilazy i sodержaniya triptamina. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem*. 2016;11(2):148–155 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

УДК 573.6.086.835

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРОЙ *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH КОРНЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Т. И. ДИТЧЕНКО¹⁾, В. М. ЮРИН¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Разработан протокол получения каллусной культуры эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench) из изолированных отрезков корней асептически выращенных проростков в качестве источника эксплантов. Протестировано 10 комбинаций синтетических ауксинов (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 1-нафтилуксусная кислота) и цитокининов (кинетин, 6-бензиламинопурин) для оптимизации прироста биомассы полученной каллусной культуры. Определены уровни накопления гидроксикоричных кислот и флавоноидов в каллусах, культивируемых в присутствии разных комбинаций фитогормонов. Установлено, что модификация минеральной основы питательной среды Мурасиге – Скуга (снижение концентрации нитрата и фосфата, полное исключение аммония) позволяет существенно повысить содержание целевых вторичных метаболитов. Показано отсутствие стимулирующего эффекта сахарозы на уровни накопления фенилпропаноидов и флавоноидов.

Ключевые слова: *Echinacea purpurea* L. Moench; каллус корневого происхождения; индекс роста; фенольные соединения; гидроксикоричные кислоты; флавоноиды.

REGULATION OF PHENOLIC SECONDARY METABOLITES PRODUCTION BY *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH CALLUS CULTURE OF ROOT ORIGIN

T. I. DITCHENKO^a, V. M. YURIN^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: T. I. Ditchenko (ditchenko@bsu.by)

The protocol for obtaining a callus culture of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L. Moench) of root origin from aseptically grown seedlings as a source of explants has been developed. To optimize the growth of callus culture biomass 10 combinations of synthetic auxins (2,4-D, NAA) and cytokinins (kinetin, BAP) have been tested. The levels of hydroxycinnamic acid and flavonoid accumulation in callus, cultivated in the presence of different combinations of phytohormones, are determined. It has been established that modification of the mineral base of the Murashige – Skoog (MS)

Образец цитирования:

Дитченко ТИ, Юрин ВМ. Регуляция продукции вторичных метаболитов фенольной природы каллусной культурой *Echinacea purpurea* L. Moench корневого происхождения. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018;2:57–64.

For citation:

Ditchenko TI, Yurin VM. Regulation of phenolic secondary metabolites production by *Echinacea purpurea* L. Moench callus culture of root origin. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:57–64 (in Russ.).

Авторы:

Татьяна Ивановна Дитченко – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Tatyana I. Ditchenko, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

ditchenko@bsu.by

Vladimir M. Yurin, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

yurin@bsu.by

nutrient medium (reduction of nitrate and phosphate concentration, complete exclusion of ammonium) makes it possible to significantly increase the content of a target secondary metabolites. It was shown that there is no stimulating effect of sucrose on the levels of phenylpropanoid and flavonoid accumulation.

Key words: *Echinacea purpurea* L. Moench; callus of a root origin; growth index; phenolic compounds; hydroxycinnamic acids; flavonoids.

Введение

Среди лекарственных растений, содержащих фенилпропаноиды, перспективным источником иммуномодуляторов являются представители рода *Echinacea* [1]. Из 11 видов эхинацеи *Echinacea purpurea* L. Moench – лидер по содержанию таких фенилпропаноидов, как гидроксикоричные кислоты (ГКК) и их производные [2]. Помимо иммуностимулирующей активности экстракты эхинацеи пурпурной проявляют тонизирующий, антиоксидантный, противовирусный, противовоспалительный и другие фармакологические эффекты [3; 4]. Биотехнологическим источником фенилпропаноидов могут выступать культуры клеток, тканей и органов *E. purpurea* [5]. В предыдущих исследованиях нами показано, что в водно-этанольных экстрактах из каллусных тканей, так же как и из надземной части растений *E. purpurea*, доминирует цикориевая кислота [6; 7]. При этом использование продукционной питательной среды для культивирования гетеротрофной каллусной культуры приводит к существенному возрастанию уровней накопления не только цикориевой, но и других производных кофейной кислоты, в частности кафтаровой, хлорогеновой. В результате суммарное содержание ГКК вдвое превышает средние уровни их накопления в традиционном лекарственном сырье [6; 7], что позволяет рассматривать полученную культуру в качестве перспективного биотехнологического источника фармакологически ценных фенилпропаноидов.

Наряду с травой эхинацеи пурпурной в медицинских целях используют корневища с корнями [8]. При исследовании уровней накопления ГКК в вегетативных органах эхинацеи пурпурной установлено, что в фазах кущения и бутонизации их содержание находится практически на одном уровне в корнях и листьях растений [9]. Можно предположить, что и культура клеток *E. purpurea*, полученная из корневых эксплантов, будет представлять интерес в качестве продуцента ценных фенилпропаноидов. Несмотря на процесс дедифференциации, предшествующий каллусогенезу и приводящий к упрощению структуры клеток и некоторой их стандартизации, тип экспланта, используемый для инициации каллусной культуры, оказывает существенное влияние на ее ростовые и биосинтетические характеристики. Различное тканевое происхождение клеток экспланта является одной из причин гетерогенности получаемой каллусной ткани, причем некоторые функциональные особенности могут передаваться как стойкие модификации при длительном субкультивировании [10].

Цель настоящей работы – получение каллусной культуры *E. purpurea* корневого происхождения и характеристика ее продукционного потенциала в отношении вторичных метаболитов фенольной природы.

Материалы и методы исследований

В качестве источника корневых эксплантов использовали асептически выращенные проростки *E. purpurea* из семян, простерилизованных с помощью хлорсодержащего дезинфицирующего средства Domestos. Процесс получения стерильных семян включал следующие этапы: 1) предварительная стерилизация (промывание семян светло-розовым раствором KMnO_4 в течение 20 мин с последующей обработкой 70 % этанолом в течение 1 мин); 2) собственно стерилизация (инкубация в растворе Domestos); 3) постстерилизация (4–5-кратное промывание стерильной водой); 4) перенос простерилизованных семян в пробирки с безгормональной агаризованной средой по прописи Мурасиге – Скуга (МС) [11]. На этапе собственно стерилизации было протестировано 6 режимов, которые различались по продолжительности воздействия стерилизующего агента Domestos (15 и 30 мин) и его концентрации (50; 33 и 25 % (v/v)). Инкубация простерилизованных семян производилась на питательной среде МС в условиях фитостата с периодичностью освещения 14 ч света / 10 ч темноты при освещенности 5000 лк.

Изоляцию эксплантов осуществляли в условиях ламинар-бокса, с помощью стерильного скальпеля корни разрезали на отрезки длиной 1,0–1,5 см и стерильно переносили на чашки Петри с питательной средой МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и кинетин в концентрациях 1–2 мг/л для индукции каллусогенеза. Инкубацию эксплантов и культивирование каллусов осуществляли в условиях термостата в темноте при 25 °С.

В целях оптимизации состава питательной среды для полученной каллусной ткани корневого происхождения в первой серии экспериментов протестировано 10 комбинаций синтетических ауксинов (2,4-Д,

1-нафтилуксусная кислота (НУК)) и цитокининов (кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП)) в среде МС, включающей 30 г/л сахарозы (табл. 1). Все варианты сред были дополнены β-индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) в концентрации 2,0 мг/л.

Таблица 1

Комбинации ауксинов и цитокининов в составе питательной среды МС, использованные для оптимизации ростовых параметров каллусной культуры *E. purpurea* корневого происхождения

Table 1

Combinations of auxins and cytokinins in the nutrient medium MS, used to optimize the growth parameters of *E. purpurea* callus culture of root origin

Вариант	Тип фитогормона		Концентрация, мг/л	
	Ауксин	Цитокинин	Ауксин	Цитокинин
1	2,4-Д	Кинетин	0,2	0,5
2	2,4-Д	Кинетин	0,5	0,5
3	2,4-Д	Кинетин	1,0	0,5
4	2,4-Д	Кинетин	0,2	1,0
5	2,4-Д	Кинетин	0,5	1,0
6	2,4-Д	Кинетин	1,0	1,0
7	НУК	БАП	0,5	0,5
8	НУК	БАП	1,0	0,5
9	НУК	БАП	0,5	1,0
10	НУК	БАП	1,0	1,0

Во второй серии экспериментов использовали модифицированные варианты питательной среды МС, которые отличались повышенной до 4 % концентрацией сахарозы (вариант 1); половинной концентрацией нитрата и фосфата, исключением аммония (вариант 2); одновременным сочетанием подходов 1 и 2 (вариант 3).

Индекс роста I (отн. ед.) определяли как отношение прироста биомассы каллусов к их начальной массе [12]. Скорость роста v (сут⁻¹) рассчитывали по формуле

$$v = \frac{m_t - m_0}{m_0 \Delta t},$$

где m_t – масса каллуса в конце цикла выращивания, г; m_0 – начальная масса каллуса, г; Δt – продолжительность культивирования, сут.

Содержание суммы фенольных соединений (ФС) в пересчете на феруловую кислоту анализировали на основе реакции комплексообразования с реактивом Фолина – Дениса, флавоноидов (ФЛ) в пересчете на кверцетин – по реакции с $AlCl_3$. Содержание ГКК определяли в пересчете на цикориевую кислоту методом прямой спектрофотометрии согласно [13]. Для количественной оценки указанных показателей использовали каллусные ткани в стационарной фазе ростового цикла.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *Microsoft Excel*. Результаты представлены как средние значения и стандартная ошибка среднего ($Mean \pm SE$). Достоверность различий между вариантами определяли на основе t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что среди протестированных режимов стерилизации семян *E. purpurea* наиболее эффективным является инкубация в растворе Domestos в концентрации 25 % (v/v) в течение 15 мин. Использование более высоких концентраций дезинфицирующего средства либо увеличение продолжительности стерилизации до 30 мин приводили к резкому снижению жизнеспособности семян.

В результате проращивания простерилизованных семян получали асептические проростки, которые в 3-недельном возрасте использовали в качестве источника корневых эксплантов. Появление первых признаков каллусогенеза на отрезках изолированных корней наблюдалось в среднем через 18–20 сут после их переноса на агаризованные среды МС, включающие фитогормоны. Наиболее активное образование

первичной каллусной ткани *E. purpurea* корневого происхождения происходило на варианте питательной среды, который включал 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетина. В данных условиях продолжительность инкубации эксплантов, необходимая для формирования первичной каллусной ткани в объеме, позволяющем провести ее субкультивирование, составляла 40–42 сут.

Поскольку гормональные эффекторы являются важнейшими компонентами питательных сред, оказывающими влияние на процессы пролиферации клеток, далее в работе были протестированы разные комбинации синтетических ауксинов и цитокининов для оптимизации ростовых параметров полученной каллусной культуры *E. purpurea*. При применении 2,4-Д и кинетина (варианты 1–6) установлено, что наиболее высокие значения индекса роста и скорости роста отмечались при использовании питательной среды, включающей 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина на фоне 2,0 мг/л ИУК (табл. 2).

Таблица 2

Влияние разных комбинаций синтетических ауксинов
и цитокининов в составе питательной среды МС на показатели
роста каллусной культуры *E. purpurea* корневого происхождения

Table 2

The effect of synthetic auxins and cytokinins combinations
in the nutrient medium MS on the growth parameters
of *E. purpurea* callus culture of root origin

Вариант	I , отн. ед.	v , сут ⁻¹
1	2,44 ± 0,07	0,070 ± 0,004
2	2,81 ± 0,14	0,086 ± 0,004
3	2,58 ± 0,08	0,076 ± 0,005
4	2,10 ± 0,06	0,062 ± 0,004
5	1,58 ± 0,05	0,049 ± 0,003
6	1,83 ± 0,06	0,059 ± 0,005
7	2,84 ± 0,20	0,079 ± 0,006
8	2,36 ± 0,29	0,065 ± 0,008
9	2,28 ± 0,27	0,063 ± 0,007
10	2,46 ± 0,19	0,068 ± 0,005

Повышение концентрации кинетина до 1,0 мг/л при всех использованных концентрациях 2,4-Д приводило к снижению значений ростовых параметров в среднем в 1,6–1,7 раза. Самые низкие величины индекса роста наблюдались для вариантов 5 и 6, поэтому в дальнейшей работе их не применяли.

При варьировании концентраций НУК и БАП значения ростовых параметров изменялись не более чем на 20–25 %. Следует отметить вариант 7, для которого индекс роста и скорость роста каллусов составили (2,84 ± 0,2) отн. ед. и (0,079 ± 0,006) сут⁻¹ соответственно, т. е. практически не отличались от показателей роста каллусов в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Особенность каллусов, выращиваемых в присутствии 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, заключалась в наличии хорошо выраженных признаков вторичной дифференцировки по типу ризогенеза.

Количественный анализ содержания вторичных метаболитов фенольной природы в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения, культивируемых в присутствии разных комбинаций фитогормонов, позволил получить данные, представленные в табл. 3.

В результате культивирования каллусов на средах с разными концентрациями 2,4-Д и кинетина суммарное содержание ФС, а также содержание ФЛ изменялись в узких пределах. Уровни накопления ГКК как доминирующей группы фенольного комплекса варьировали в большей степени – от (4,20 ± 0,19) до (6,00 ± 0,15) мг/г сухого вещества. Наиболее высоким содержанием ФС и ГКК характеризовались каллусы, выращенные в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, в случае ФЛ – в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Снижение концентрации 2,4-Д в питательной среде до 0,2 мг/л сопровождалось достоверным уменьшением анализируемых показателей.

При использовании НУК и БАП более высокое содержание ФС и ГКК отмечалось для каллусов, выращенных в присутствии 0,5 мг/л либо 1,0 мг/л каждого фитогормона, в случае ФЛ – в присутствии концентраций, равных 1,0 мг/л.

Таблица 3

Уровни накопления вторичных метаболитов фенольной природы в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения при варьировании типа и концентрации ауксинов и цитокининов в питательной среде МС

Table 3

Levels of accumulation of phenolic secondary metabolites in *E. purpurea* calluses of root origin by varying the auxins and cytokinins type and concentration in nutrient medium MS

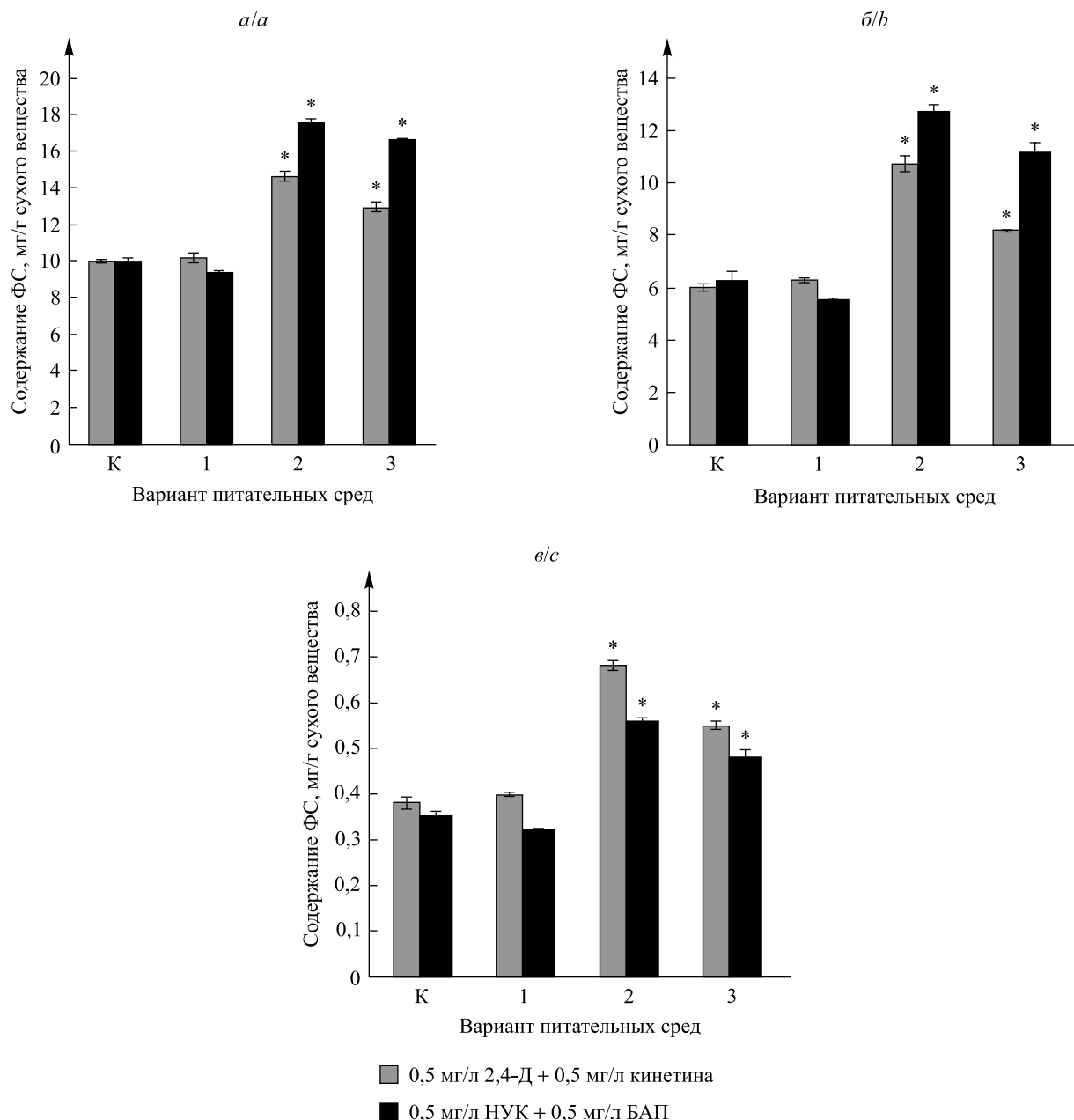
Комбинация фитогормонов	Содержание, мг/г сухого вещества		
	ФС	ГКК	ФЛ
0,2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина	9,15 ± 0,07	5,40 ± 0,17	0,34 ± 0,010
0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина	9,99 ± 0,09	6,00 ± 0,15	0,38 ± 0,013
1,0 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина	9,70 ± 0,29	5,89 ± 0,17	0,40 ± 0,008
0,2 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина	8,59 ± 0,35	4,20 ± 0,19	0,36 ± 0,006
0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП	9,98 ± 0,22	6,23 ± 0,41	0,35 ± 0,012
1,0 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП	9,34 ± 0,38	5,99 ± 0,06	0,33 ± 0,003
0,5 мг/л НУК + 1,0 мг/л БАП	7,58 ± 0,18	4,42 ± 0,11	0,36 ± 0,030
1,0 мг/л НУК + 1,0 мг/л БАП	9,73 ± 0,28	6,19 ± 0,08	0,44 ± 0,023

Синтетические ауксины 2,4-Д и НУК зачастую оказывают противоположное влияние на уровни накопления вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей растений [14]. В частности, для каллусной культуры *E. purpurea* листового происхождения исключение из питательной среды 2,4-Д приводило к заметному росту уровней накопления ГКК. Еще более существенное повышение их содержания (в 2,5 раза) отмечалось в результате замены 2,4-Д на НУК [6]. Особенность полученной каллусной культуры *E. purpurea* корневого происхождения состоит в том, что 2,4-Д и НУК в одинаковой степени способствуют реализации не только ее ростового, но и биосинтетического потенциала в отношении ГКК и их производных. Похожая картина имела место в случае каллусной культуры *Camellia sinensis* L., для которой замена 2,4-Д на НУК в составе питательной среды приводила к незначительным изменениям в способности к образованию ФС [15].

Проведенное тестирование влияния разных комбинаций синтетических ауксинов и цитокининов на показатели прироста биомассы и содержание фенилпропаноидов в каллусах *E. purpurea*, инициированных из корневых эксплантов, позволяет выделить два наиболее оптимальных варианта сред, включающих 2,4-Д и кинетин, а также НУК и БАП в концентрациях, равных 0,5 мг/л. В дальнейшей работе эти варианты использованы для поддержания двух стабильных клеточных линий *E. purpurea* корневого происхождения. Следует отметить, что содержание ГКК в отобранных клеточных линиях по своей величине уступает уровням их накопления ((12,1 ± 0,8) мг/г сухого вещества) в каллусной культуре *E. purpurea* листового происхождения [7]. Следовательно, для стимуляции биосинтетического потенциала полученной каллусной культуры требуется оптимизация состава питательной среды, физических параметров, культивирования и др.

Среди компонентов питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей значительное влияние на уровни накопления вторичных метаболитов помимо гормональных эффекторов оказывает обеспеченность источниками углеводного питания (сахароза), макроэлементами (в частности, азот, фосфор) [16]. Для каллусной культуры *E. purpurea*, инициированной из листовых эксплантов, в условиях дефицита азота и фосфора в питательной среде МС на фоне повышенного содержания сахарозы отмечалось резкое возрастание продукции ГКК и их производных [6]. В связи с этим во второй серии экспериментов использовались модифицированные варианты питательной среды МС, которые отличались концентрацией сахарозы, нитратного и аммонийного азота, фосфата. В качестве фитогормонов модифицированные варианты сред включали 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина либо 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП на фоне 2,0 мг/л ИУК.

Как видно из рисунка, дефицит азота и фосфора в питательной среде (вариант 2) приводил к резкому возрастанию уровней накопления суммы ФС в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения. Наиболее высокое содержание ФС ((17,53 ± 0,24) мг/г сухого вещества) отмечалось для каллусов, инкубируемых в присутствии 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Повышенная концентрация сахарозы не вызвала достоверных изменений уровней накопления ФС при использовании полной питательной среды МС (вариант 1), а в условиях дефицита азота и фосфора даже приводила к снижению стимулирующего эффекта (вариант 3).



Уровни накопления суммы ФС (а), ГКК (б) и ФЛ (в) в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения при варьировании состава питательной среды МС:

К – контроль; 1 – повышение концентрации сахарозы до 4 %;

2 – снижение вдвое концентрации нитрата и фосфата, исключение аммония;

3 – сочетание вариантов 1 и 2; * – различия достоверны относительно контроля при $p \leq 0,05$

Accumulation levels of phenolic compounds sum (a), hydroxycinnamic acids (b) and flavonoids (c) in *E. purpurea* calluses of root origin by varying the composition of the nutrient medium MS:

К – control; 1 – increase of sucrose concentration up to 4 %;

2 – halving the concentration of nitrate and phosphate, excluding ammonium;

3 – combination of options 1 and 2; * – differences are reliable, $p \leq 0,05$

При анализе уровней накопления ГКК и их производных были обнаружены аналогичные закономерности. Наиболее высокое содержание ($(12,71 \pm 0,28)$ мг/г сухого вещества) отмечалось для каллусов, инкубируемых на втором варианте питательной среды в присутствии 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Стимулирующий эффект дефицита азота и фосфора достигал в среднем 2,0 раза относительно контроля. Повышение концентрации сахарозы до 4 % в этих условиях, наоборот, приводило к ингибированию биосинтетического потенциала культуры.

В отличие от ГКК и суммы ФС наиболее высокое содержание ФЛ в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения отмечалось на втором варианте питательной среды в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д

и 0,5 мг/л кинетина. Повышение концентрации сахарозы оказывало отрицательное влияние на уровни накопления ФЛ в условиях дефицита азота и фосфора независимо от типа используемых ауксинов и цитокининов.

Таким образом, изменение минеральной основы питательной среды МС приводит к более заметным сдвигам в биосинтезе вторичных метаболитов фенольной природы в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения по сравнению с влиянием фитогормонов. Высокое содержание аммонийного и нитратного азота является характерной особенностью питательной среды МС. Ограничение источников азотного питания вплоть до полного исключения аммония заключается в изменении баланса между первичным и вторичным метаболизмом культивируемых растительных клеток в сторону последнего. Для исследуемой каллусной культуры это выражается в практически 2-кратном повышении уровней накопления ГКК и ФЛ. В аналогичных условиях рост содержания ГКК в каллусах *E. purpurea* листового происхождения составлял в среднем 3,5 раза [6].

Достаточно распространенным подходом для увеличения продукции вторичных метаболитов в культурах растительных клеток является использование повышенных концентраций сахарозы [16; 17]. При культивировании каллусной ткани *E. purpurea* листового происхождения на средах с 4 % сахарозой было выявлено возрастание уровней накопления ГКК в 1,5 раза по сравнению с контролем [6]. В случае культуры корневого происхождения использование повышенной концентрации оказалось неэффективным (см. рисунок). Причем на фоне снижения содержания аммонийного и нитратного азота, фосфата добавление в среды 4 % сахарозы приводило к уменьшению величины стимулирующего эффекта дефицита указанных макроэлементов. Для каллусной культуры листового происхождения в аналогичных условиях, наоборот, обнаруживался синергетический эффект [6]. Можно предположить, что указанные различия обусловлены эпигенетическими особенностями каллусных тканей, полученных из эксплантов разного происхождения. В частности, положительное влияние сахарозы проявляется для каллусной культуры, инициированной из фотосинтезирующих тканей. Таким образом, использование стандартных подходов для создания продукционной питательной среды позволило выявить различия в ответных реакциях каллусных культур *E. purpurea* корневого и листового происхождения.

Заключение

Каллусная культура *E. purpurea* корневого происхождения сохраняет способность интактного растения к синтезу таких вторичных метаболитов фенольной природы, как ГКК и ФЛ. Наиболее высокое содержание суммы ФС, в том числе фенилпропаноидов, отмечается в присутствии равных 0,5 мг/л концентраций 2,4-Д и кинетина либо НУК и БАП, тогда как наиболее высокое содержание ФЛ – под влиянием 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. Существенное возрастание биосинтетического потенциала исследуемой каллусной культуры в отношении вторичных метаболитов фенольной природы может быть достигнуто за счет модификации минеральной основы питательной среды МС – снижения вдвое концентрации нитрата и фосфата, полного исключения аммония. В условиях дефицита азота и фосфора в питательной среде МС, включающей 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, содержание ФС и ГКК в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения возрастает в 1,8–2,0 раза. Аналогичный рост содержания ФЛ отмечается в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Использование повышенной до 4 % концентрации сахарозы не приводит к стимуляции образования ФС. Установленные закономерности регуляции продукции вторичных метаболитов фенольной природы каллусами *E. purpurea* корневого происхождения создают методическую основу для разработки лабораторного регламента наработки биомассы разных линий полученной клеточной культуры с высоким удельным содержанием фармакологически ценных веществ, характеризующихся иммуностимулирующей, адаптогенной, антиоксидантной активностью.

Библиографические ссылки

1. Куркин ВА. Фенилпропаноиды как важнейшая группа биологически активных соединений лекарственных растений. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015;12(7):1338–1342.
2. Самородов АВ, Поспелов СВ, Моисеева ГФ, Середя АВ. Фитохимический состав представителей рода эхинацеи и его фармакологические свойства. *Химико-фармацевтический журнал*. 1996;30(4):32–37.
3. Куцук РВ, Зузук БМ, Рыбак ОВ. Иммунокорригирующие и противовоспалительные свойства биологически активных веществ растений рода *Echinacea* Moench. *Провизор*. 2002;5:53–60.
4. Бизунок НА. Фармакологические свойства эхинацеи. *Рецепт*. 2008;5:42–52.
5. Abbasi BH, Saxena PK, Murch SJ, Liu C-Z. *Echinacea* biotechnology: challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2007;43(6):481–492. DOI: 10.1007/s11627-007-9057-2.
6. Дитченко ТИ, Юрин ВМ. Разработка состава продукционной питательной среды для культивирования каллусной ткани эхинацеи пурпурной в качестве источника гидроксикоричных кислот. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2011;6(1):39–46.
7. Дитченко ТИ, Шабуня ПС, Фатыхова СА, Молчан ОВ, Юрин ВМ. Анализ производных кофейной кислоты в каллусной культуре *Echinacea purpurea*. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017;7(2):54–63.

8. Куркин ВА. Лекарственные растения как источник импортозамещающих препаратов. *Фундаментальные исследования*. 2013;8(1):139–142.
9. Дойко ИВ, Тихомиров АА, Чепелева ГГ, Леонтьева ВМ. Динамика накопления гидроксикоричных кислот в различных частях растений эхинацеи пурпурной и рудбекии волосистой, выращенных в условиях светокультуры. *Химия растительного сырья*. 2002;3:35–37.
10. Бутенко РГ. *Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе*. Москва: ФБК-ПРЕСС; 1999.
11. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
12. Носов АМ. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений. В: Ралдугина ГН, Данилова СА, Юрьева НО, Кузнецов ВВ. *Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений*. Москва: БИОНОМ; 2011. с.386–403.
13. Куркин ВА, Авдеева ОИ, Авдеева ЕВ, Мизина ПГ. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea*. *Растительные ресурсы*. 1998;34(2):81–85.
14. Смоленская ИН, Решетняк ОВ, Смирнова ЮН, Черняк НД, Глоба ЕБ, Носов АМ и др. Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов. *Физиология растений*. 2007;54:243–252.
15. Николаева ТН, Загоскина НВ, Запрометов НВ. Образование фенольных соединений в каллусных культурах чайного дерева под действием 2,4-Д и 1-НУК. *Физиология растений*. 2009;56(1):53–58.
16. Endress R. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg; 1994.
17. Villarreal MO, Howat S, Hong S, Jang MO, Jin Y-W, Lee E-K, et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*. 2016;49(3):149–158.

References

1. Kurkin VA. Fenilpropanoidy kak vazhneishaya gruppa biologicheskii aktivnykh soedinenii lekarstvennykh rastenii [Phenylpropanoids as the most important group of biologically active compounds of medicinal plants]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015;12(7):1338–1342 (in Russ.).
2. Samorodov AV, Pospelov SV, Moiseeva GF, Sereda AV. Fitokhimicheskie sostav predstavitelei roda ekhinatseya i ego farmakologicheskie svoystva [Phytochemical composition of genus *Echinacea* and its pharmacological properties]. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 1996;30(4):32–37 (in Russ.).
3. Kutsik RV, Zuzuk BM, Rybak OV. Immunokorrigiruyushchie i protivovospalitel'nye svoystva biologicheskii aktivnykh veshchestv rastenii roda *Echinacea* Moench [Immunocorrective and anti-inflammatory properties of biologically active substances of plants of genus *Echinacea* Moench]. *Provizor*. 2002;5:53–60 (in Russ.).
4. Bizunok NA. Farmakologicheskie svoystva ekhinatsei [Pharmacological properties of *Echinacea*]. *Retsept*. 2008;5:42–52 (in Russ.).
5. Abbasi BH, Saxena PK, Murch SJ, Liu C-Z. *Echinacea* biotechnology: challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2007;43(6):481–492. DOI: 10.1007/s11627-007-9057-2.
6. Ditchenko TI, Yurin VM. The development of productional medium for *Echinacea purpurea* callus tissue as a source of hydroxycinnamic acids. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem*. 2011;6(1):39–46 (in Russ.).
7. Ditchenko TI, Shabunya PS, Fatykhova SA, Molchan OV, Yurin VM. Analiz proizvodnykh kofeinoi kisloty v kallusnoi kul'ture *Echinacea purpurea* [Analysis of caffeic acid derivatives in *Echinacea purpurea* callus culture]. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*. 2017;7(2):54–63 (in Russ.).
8. Kurkin VA. Lekarstvennye rasteniya kak istochnik importozameshchayushchikh preparatov [Medicinal plants as a source of import-substituting drugs]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013;8(1):139–142 (in Russ.).
9. Doiko IV, Tikhomirov AA, Chepeleva GG, Leont'eva VM. Dinamika nakopleniya gidroksikorichnykh kislot v razlichnykh chastyakh rastenii ekhinatsei purpurnoi i rudbekii volosistoi, vyrashchennykh v usloviyakh svetokul'tury [Dynamics of hydroxycinnamic acid accumulation in various parts of purple coneflower and rudbeckia hirta plants grown under the conditions of light culture]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2002;3:35–37 (in Russ.).
10. Butenko RG. *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove* [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology]. Moscow: FBK-PRESS; 1999 (in Russ.).
11. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
12. Nocos AM. Metody otsenki i kharakteristiki rosta kul'tur kletok vysshikh rastenii [Methods for assessing and characterizing the growth of cell cultures of higher plants]. In: Ralduina GN, Danilova SA, Yur'eva NO, Kuznetsov VV. *Moлекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений*. Moscow: BIONOM; 2011. p.386–403 (in Russ.).
13. Kurkin VA, Avdeeva OI, Avdeeva EV, Mizina PG. Kolichestvennoe opredelenie summy gidroksikorichnykh kislot v nadzemnoi chasti *Echinacea purpurea* [Quantative determination of the amount of hydroxycinnamic acids in the aerial part of *Echinacea purpurea*]. *Rastitel'nye resursy*. 1998;34(2):81–85 (in Russ.).
14. Smolenskaya IN, Reshetnyak OV, Smirnova YN, Chernjak ND, Globa EB, Nosov AM, et al. Protivopolozhnoe vliyanie sinteticheskikh auksinov – 2,4-dikhlorfenoksiuksusnoi i 1-naftiluksusnoi kislot na rost kul'tury kletok zhen'shenya nastoyashchego i sintez ginsenosidov [The opposite effect of synthetic auxins – 2,4-dichlorophenoxyacetic and 1-naphthylacetic acid on the growth of ginseng cell culture and ginsenoside synthesis]. *Fiziologiya rastenii*. 2007;54:243–252 (in Russ.).
15. Nikolaeva TN, Zagoskina NV, Zaprometov NV. Obrazovanie fenol'nykh soedinenii v kallusnykh kul'turakh chainogo dereva pod deistviem 2,4-D i 1-NUK [Formation of phenolic compounds in callus cultures of tea tree by action of 2,4-D and 1-NAA]. *Fiziologiya rastenii*. 2009;56(1):53–58 (in Russ.).
16. Endress R. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg; 1994.
17. Villarreal MO, Howat S, Hong S, Jang MO, Jin Y-W, Lee E-K, et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*. 2016;49(3):149–158.

Статья поступила в редакцию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

УДК 574.524;574.55;574.583;574.633

ПИГМЕНТНЫЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕР НАРОЧЬ И МЯСТРО

О. С. СМОЛЬСКАЯ¹⁾, А. А. ЖУКОВА¹⁾, А. С. ЛЮЛЯ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

В образцах поверхностного слоя донных отложений озер Нарочь и Мясстро, собранных летом 2016 и 2017 гг., были изучены основные физико-химические параметры (плотность, влажность и удельное содержание органического вещества), а также содержание хлорофилла и продуктов его распада. Рассчитаны пигментные индексы, отражающие состояние продуцентов в экосистеме, в первую очередь фитопланктона: E_{450}/E_{480} , E_{480}/E_{664} , E_{430}/E_{664} , E_{480}/E_{665} , $E_{480}/1,7E_{665k}$, E_{430}/E_{412} . Предложены вспомогательные пигментные индексы контроля чистоты экстракта и четкости прописанного спектра: E_{664}/E_{720} , E_{430}/E_{720} , E_{412}/E_{720} , E_{530}/E_{720} , E_{430}/E_{530} , E_{664}/E_{530} и E_{412}/E_{664} . Эти индексы могут быть использованы как критерии качества исследованной пробы и ее пригодности для расчета пигментных индексов состояния экосистемы.

Ключевые слова: донные отложения; влажность; плотность; содержание органических веществ; хлорофилл; феопигменты; спектр поглощения; пигментные индексы.

ANALYSIS OF PIGMENT, PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF BOTTOM SEDIMENTS IN LAKES NAROCH AND MYASTRO

O. S. SMOLSKAYA^a, H. A. ZHUKAVA^a, A. S. LYULYA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: O. S. Smolskaya (syylimova_1991@mail.ru)

In the samples of the surface layer the bottom sediments of the Naroch and Myastro lakes, collected in the summer of 2016 and 2017, the main physical and chemical parameters (density, wetness and organic matter content), as well as the content of chlorophyll and its decay products were studied. Pigment indices that reflect the general condition of the producers in the ecosystem, primarily phytoplankton: E_{450}/E_{480} , E_{480}/E_{664} , E_{430}/E_{664} , E_{480}/E_{665} , $E_{480}/1,7E_{665k}$, E_{430}/E_{412} were calculated. The auxiliary pigment indexes suggested for controlling the purity of the extract and the clarity of the prescribed spectrum: E_{664}/E_{720} , E_{430}/E_{720} , E_{412}/E_{720} , E_{530}/E_{720} , E_{430}/E_{530} , E_{664}/E_{530} , E_{412}/E_{664} ; can be used as quality criteria of the tested sample and its suitability for the calculation of pigment indices characterizing the state of producers in an ecosystem.

Key words: bottom sediments; humidity; density; organic matter content; chlorophyll; phaeopigments; absorption spectrum; pigment indices.

Образец цитирования:

Смольская ОС, Жукова АА, Люля АС. Пигментные и физико-химические характеристики донных отложений озер Нарочь и Мясстро. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;2:65–77.

For citation:

Smolskaya OS, Zhukava HA, Lyulya AS. Analysis of pigment, physical and chemical characteristics of bottom sediments in lakes Naroch and Myastro. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:65–77 (in Russ.).

Авторы:

Ольга Сергеевна Смольская – аспирантка кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета. Научный руководитель – А. А. Жукова.

Анна Анатольевна Жукова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры экологии и методики преподавания биологии биологического факультета.

Анастасия Сергеевна Люля – студентка биологического факультета.

Authors:

Ol'ga S. Smolskaya, postgraduate student at the department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.

syylimova_1991@mail.ru

Hanna A. Zhukava, PhD (biology), docent; associate professor at the department of ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.

anna_eco@tut.by

Anastasia S. Lyulya, student at the faculty of biology.

Введение

Оценка экологического состояния разнотипных водных объектов, вне зависимости от трофического статуса, должна учитывать все этапы трансформации органического вещества в водоеме с момента его образования продуцентами до разложения редуцентами. Донные отложения дают ценную информацию о структурно-функциональных особенностях пресноводных экосистем, поскольку способны накапливать биогенные элементы и органические вещества, что служит причиной эвтрофирования, могут способствовать выведению загрязняющих веществ из биотического круговорота и являются местом их депонирования [1].

На сегодняшний день из-за отсутствия постоянного мониторинга сложно оценить состояние многих пресноводных объектов. Для того чтобы понять причины и механизмы изменения трофического состояния водоемов, следует учитывать все важные биологические факторы и антропогенные воздействия на пресноводные экосистемы, совершенствовать методы исследования. Именно с этой целью необходимо вести регулярные наблюдения в природных условиях, а не только оценивать состояние экосистемы по расчетам в лабораториях.

Для гидробиологических исследований остается актуальным поиск быстрых и информативных показателей оценки экологического состояния водоемов. Одним из ключевых элементов для решения этой задачи может служить содержание хлорофилла – этот подход положен в основу шкал, разработанных для оценки трофического статуса водоемов и качества воды. Дополнительную информацию о состоянии планктонных продуцентов также могут дать характеристики пигментного состава фитопланктона [2].

Растительные пигменты в современной гидробиологии используются как показатели, с помощью которых можно определить антропогенное влияние на водоемы, продуктивность экосистемы, процессы, которые происходят внутри водного объекта. Любой водоем характеризуется определенным пигментным фоном в зависимости от присутствующих растительных сообществ, производящих первичную продукцию. Одним из важных индикаторов физико-химического состояния и обменных процессов в водоемах являются растительные пигменты и продукты их трансформации, сохраняющиеся в донных отложениях [1].

Донные отложения в озерах включают широкий спектр каротиноидов, хлорофиллов и других липид-растворимых пигментов, продуцируемых фототрофными организмами как в водоеме, так и в окружающем его водосборном бассейне. Донные отложения также содержат производные самых распространенных пигментов, включая изомеры, алломеры и разнообразные пигментспецифические структурные модификации. Пигменты донных отложений обладают некоторыми свойствами, благодаря которым представляют интерес для гидробиологии, как то: общие исходные биосинтетические пути в каждом классе молекул; различные химические структуры, возникающие в результате специфических стадий во время биосинтеза; повсеместное распространение среди автотрофных организмов с некоторыми таксономическими особенностями; относительная легкость анализа [3].

Основными источниками пигментов в водоемах являются сообщества планктонных и бентосных водорослей, автотрофных популяций бактерий и высших водных растений. В дальнейшем пигменты деградируют как в водной толще, так и при последующем осаждении в отложениях. Трансформация пигментов в водной толще обычно очень обширная и включает комплексные процессы, которые определяют количество и пигментный состав в поверхностных осадках. Дegradaция пигментов в донных отложениях слабо выражена, особенно при бескислородном состоянии, но может зависеть от наличия в них беспозвоночных.

Процессы деградации различаются между хлорофиллами и каротиноидами. Так, каротиноиды превращаются в *цис*-каротиноиды, а затем в бесцветные соединения путем расщепления конъюгированной (диеновой) системы, хлорофиллы обычно деградируют до феофитинов за счет потери атомов магния из тетрапирольного кольца и феофорбидов после потери фитольной цепи и различных боковых групп [3].

В последнее время в научной литературе анализируется возможность по характеру спектров поглощения света пигментами определять некоторые важные структурные показатели фитопланктона в водной толще и донных отложениях. В частности, в коротковолновой области спектра поглощения установлено отличие некоторых групп водорослей и цианобактерий от других групп в зависимости от присутствующего типа хлорофилл-белкового комплекса и фукоксантина или фикобилинов, и на этой основе разработан способ оценки качества воды по пигментному индексу E_{450}/E_{480} [2; 4]. Показано, что соотношение хлорофиллов, феопигментов и каротиноидов фитопланктона является значимым для оценки качества вод, при этом применяют пигментные индексы E_{480}/E_{664} , E_{430}/E_{664} , которые могут отражать физиологическое состояние водорослей и функционирование планктонного сообщества в целом [5]. Темпы деградации сильно различаются среди различных пигментов. Самые быстрые разрушения

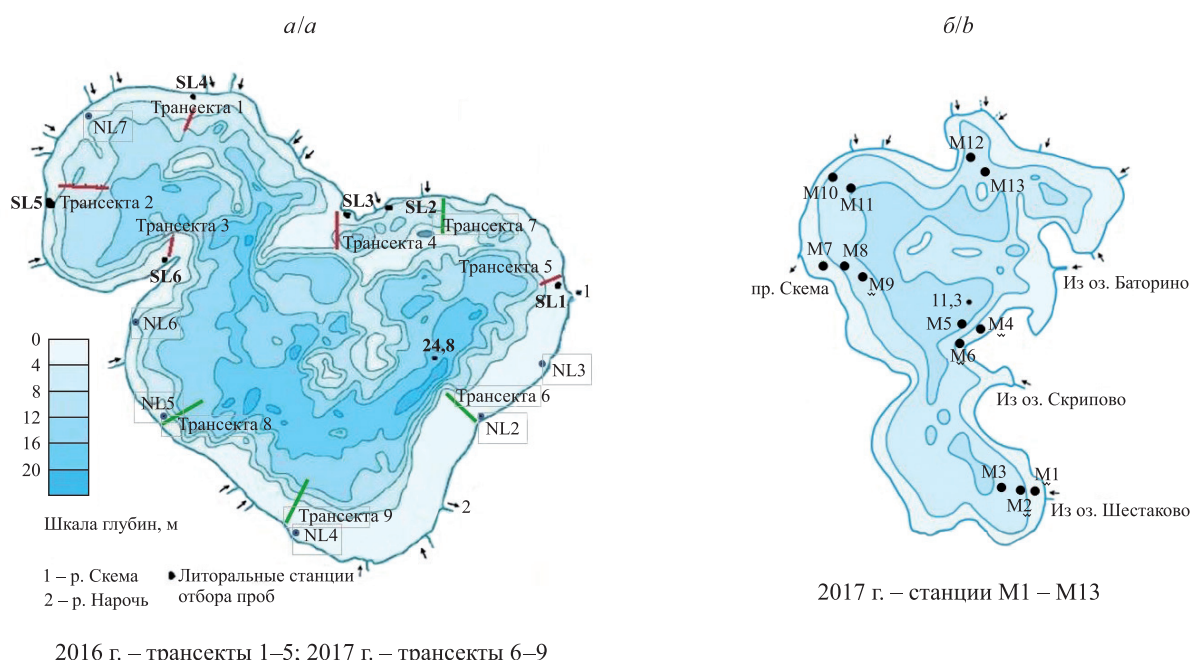
происходят, когда пигменты подвергаются одновременному действию высокой интенсивности излучения, температуры и кислорода, т. е. находятся в состоянии, характерном для эпилимниона водоемов. Кроме того, важно учитывать скорость осаждения органического биогенного материала, на которую оказывают влияние многие факторы, например питание планктонных беспозвоночных и скорость осаждения клеток. Все эти особенности необходимо учитывать при исследовании пигментного состава фитопланктона и донных осадков и изучении спектров их поглощения [3; 6].

Основным подходом, который позволяет определить содержание растительных пигментов в водной толще и донных отложениях, является спектрофотометрический метод [6; 7]. Зарубежными авторами широко используется оценка культуры фитопланктона по содержанию фотосинтетических пигментов, так как последние специфичны для растительного материала и их спектрофотометрическая оценка довольно проста. Однако необходимо помнить, что наличие в природных водах продуктов деградации пигментов, имеющих видимые спектры поглощения, аналогичные тем, которые относятся к хлорофиллам, служит источником возможных ошибок определения [8]. В связи с этим актуальной является апробация разработанных методик в полевых условиях на примере хорошо изученных в гидро-экологическом отношении водных экосистем. Интерес для дальнейшего исследования представляет установление связи содержания растительных пигментов в донных отложениях с трофическим состоянием водной экосистемы [2].

Цель данной работы – определение спектров поглощения пигментов и оценка спектральных пигментных индексов для донных отложений озер Нарочь и Мясро.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на базе УНЦ «Нарочанская биологическая станция имени Г. Г. Винберга» во второй половине июля 2016 г. и 2017 г. Отбор проб выполняли вручную при помощи водолазного оборудования. В 2016 г. материал был собран в оз. Нарочь с 28 учетных площадок, на пяти трансектах, расположенных в основном по периферии Малого плеса озера. В 2017 г. была дообследована акватория Большого плеса (собран материал с 17 учетных площадок на четырех трансектах), а также проведено обследование оз. Мясро (собран материал с 13 учетных площадок) (см. рисунок).



Картограммы отбора проб на исследованных станциях озер Нарочь (а) и Мясро (б)
The sampling maps at the stations of the Naroch (a) and Myastro (b) lakes

Для определения содержания хлорофилла и феопигментов в общем экстракте использовали спектрофотометрический метод [9; 10], который широко применяется для изучения продуктивности фитопланктона в разнотипных водных объектах и отличается простотой определения и экспрессностью в получении результатов. Однако этот метод применим только для приблизительной оценки общего содержания хлорофиллов как в толще воды, так и в донных отложениях по величине светопоглощения на участках

спектров, соответствующих максимумам в синей и красной областях; он не дает возможности получить истинные концентрации отдельных пигментов [9].

Спектры поглощения пигментов в донных отложениях определяли с использованием спектрофотометра Cary 50 (USA) (приложение Scan). Пробы донных отложений в 2016 г. обрабатывали в течение суток после отбора. Пробы 2017 г. обрабатывали дважды, сразу после их отбора и спустя 1,5 мес. хранения в холодильнике, в целях изучения изменения пигментных комплексов при хранении.

Собранные образцы грунта перемешивали до однородной массы, из которой отбирали навеску для анализа содержания хлорофилла (суммарного, без поправки на присутствие в смеси других пигментов) и феопигментов [11], считывания спектра поглощения и расчета пигментных индексов; оставшуюся часть использовали для определения плотности и влажности грунта, а также содержания в нем органического вещества. В зависимости от типа грунта исходная влажная масса исследованной навески колебалась от 2,2 до 11,0 г. Навеску грунта взвешивали на электронных весах (SPU 202, USA), помещали в пробирки и заливали 90 % ацетоном, перемешивали и оставляли на несколько часов для экстракции в темном месте. Далее пробирки центрифугировали дважды по 15 мин при 5000 об/мин, полученный экстракт осторожно переносили в стеклянные пробирки для измерения на спектрофотометре. Измерение оптической плотности экстракта на различных длинах волн проводили в диапазоне 350–800 нм с шагом 1 нм в исходных ацетоновых экстрактах и пробах, подкисленных несколькими каплями 0,01 N соляной кислоты (хлорофиллы переходят в феопигменты), при этом использовали кварцевую кювету длиной 2 см.

Контроль чистоты экстракта проводили по светопоглощению на длине волны 750 нм (720 нм) [6]. Известно, что абсолютно чистый раствор пигментов (т. е. с нулевой оптической плотностью или стопроцентным пропусканием на указанном диапазоне длин волн) очень трудно получить на природном материале. Поэтому допустимой считается величина, равная 0,005 в расчете на 1 см слоя раствора при оптимальной оптической плотности [9], т. е. для кюветы длиной 2 см допустимая величина составляет 0,01. Если последняя имеет более высокое значение, то центрифугирование следует повторить.

По спектрам поглощения комплекса пигментов донных отложений были рассчитаны значения пигментных индексов, которые использовали для анализа возможности применения спектрального подхода к оценке состояния исследованных водных объектов. При статистической обработке данных использовали программные пакеты *Microsoft Excel* и *Statistica 8.0*.

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно стандартным методам [6; 7] для расчета концентрации хлорофиллов, кроме измерений на участках максимального для пигментов светопоглощения, проводят также измерения в крайней длинноволновой области видимого спектра на длине волны 750 нм. Это необходимо, чтобы убедиться в отсутствии неспецифического поглощения света, возникающего за счет взвесей и растворимых окрашенных соединений, среди которых могут быть и дериваты некоторых пигментов. В одной из предыдущих работ [12], анализируя пигментный состав взвешенного в воде вещества разнотипных водоемов, нами было сделано заключение, что нет статистически значимой разницы между значениями светопоглощения на длинах волн 720 и 750 нм, поэтому можно сократить длину изучаемого отрезка спектра с 750 до 720 нм, что уменьшит объем временных затрат на получение спектра и ускорит анализ данных. Выводы сделаны на основании результатов анализа многолетних наблюдений, когда не было выявлено различий в спектральных данных, относящихся к различным водным объектам и собранных в разные временные промежутки, на длинах волн 750 и 720 нм.

В рамках нашего исследования был также проведен аналогичный статистический анализ спектральных данных для донных отложений. Проанализировав весь массив данных на различных глубинах озер, можно заключить, что в 2016 г. светопоглощение на длине волны 750 нм изменялось в пределах 0,002–0,010, составив в среднем ($\pm SD$) $0,008 \pm 0,002$; в 2017 г. значения колебались от 0,001 до 0,010, в среднем $0,006 \pm 0,007$ [13]. По результатам сравнения двух групп значений светопоглощения (при длинах волн 720 и 750 нм) с помощью U-теста Манна – Уитни (Mann – Whitney U test) получено: $P = 0,85$ в 2016 г.; $P = 0,80$ в 2017 г. Таким образом, тест указывает на отсутствие статистически значимой разницы между массивами данных с измерениями светопоглощения на длинах волн 750 и 720 нм для донных отложений.

Исследование базовых физико-химических показателей донных отложений (табл. 1, 2) показало, что на мелководных участках оз. Нарочь (около 2 м) донные отложения представлены песком, который при погружении в глубь озера сменяется заиленным песком (3,5 м) и далее (6–8 м) – разного типа сапропелями. В оз. Мясро на исследованных станциях донные грунты также представлены заиленным песком и сапропелями (табл. 3).

Таблица 1

Физико-химические свойства донных отложений оз. Нарочь
и содержание в них хлорофилла и феопигментов, 2016 г.

Table 1

Physical and chemical properties of bottom sediments of the lake Naroch
and the content of chlorophyll and phaeopigments, 2016

Станция	Глубина станции, м	Содержание хлорофилла*, мкг/г	Доля феопигментов в общем форбине, %	Относительная влажность**, %	Плотность**, г/см ³	Органическое вещество**, % в сухой массе
Трансекта 1						
S1	1,9	12,32	90,70	23,1 ± 2,2	1,31 ± 0,08	0,7 ± 0,1
S3	3,1	11,42	94,88	74,8 ± 4,7	1,27 ± 0,03	4,3 ± 0,2
S4	3,0	2,95	83,57	74,6 ± 1,2	1,32 ± 0,10	4,2 ± 0,5
S6	3,1	—	—	76,3 ± 7,3	1,26 ± 0,06	4,3 ± 0,7
Трансекта 2						
S7	6,6	9,03	≈100	86,0 ± 2,0	1,18 ± 0,02	15,6 ± 0,9
S8	5,5	9,18	≈100	—	—	—
S9	4,7	7,82	88,29	97,9 ± 0,3	1,17 ± 0,03	1,2 ± 0,3
S10	3,0	3,09	84,02	74,3 ± 3,5	1,27 ± 0,16	4,3 ± 0,5
S11	2,5	16,96	89,03	37,9 ± 4,8	1,30 ± 0,21	2,6 ± 0,6
S13	2,1	7,99	91,04	34,1 ± 1,4	1,30 ± 0,13	2,2 ± 0,2
S14	2,2	8,25	99,87	34,9 ± 0,3	1,29 ± 0,08	2,5 ± 0,5
S15	2,2	4,72	96,87	37,5 ± 1,2	1,28 ± 0,02	2,6 ± 0,5
S16	1,5	4,19	89,53	28,9 ± 0,5	1,33 ± 0,02	0,6 ± 0,0
Трансекта 3						
S17	4,6	2,23	≈100	78,1 ± 3,2	1,25 ± 0,06	6,2 ± 0,1
S18	1,8	4,13	92,30	24,4 ± 1,8	1,52 ± 0,06	0,6 ± 0,1
S19	1,6	9,37	94,30	25,5 ± 0,9	1,33 ± 0,00	0,7 ± 0,2
Трансекта 4						
S20	1,6	1,57	93,47	23,3 ± 2,2	1,36 ± 0,06	0,4 ± 0,1
S21	1,7	4,76	81,43	27,1 ± 1,8	1,33 ± 0,04	0,6 ± 0,04
S22	2,1	3,73	98,40	37,4 ± 0,0	1,36 ± 0,22	2,4 ± 0,4
S23	2,4	9,48	89,38	60,0 ± 3,5	1,29 ± 0,06	4,0 ± 0,5
S24	3,0	5,59	88,71	75,8 ± 1,7	1,27 ± 0,07	4,4 ± 0,6
Трансекта 5						
S25	2,6	0,93	≈100	58,3 ± 5,9	1,49 ± 0,15	4,3 ± 0,7
S26	3,8	3,06	85,22	79,8 ± 5,3	1,39 ± 0,09	7,0 ± 0,8
S27	4,5	4,10	76,92	73,0 ± 1,5	1,25 ± 0,05	5,7 ± 2,2
S28	7,0	1,98	99,30	92,1 ± 3,1	1,12 ± 0,03	18,2 ± 0,5
S29	7,4	4,07	96,26	95,4 ± 1,7	1,07 ± 0,04	25,3 ± 2,0

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: * – без поправки на присутствие феопигментов; ** – средние ± SD для 3 повторностей.

Всего за 2016 г. было отобрано 25 проб на глубинах от 1,5 до 7,4 м, относящихся к 5 трансектам. С увеличением глубины возрастает относительная влажность седиментов, снижается их плотность и повышается содержание органических веществ.

На исследованных станциях содержание хлорофилла *a* и продуктов его распада было невысоким и составило в среднем ($6,1 \pm 3,1$) мкг/г сырой массы донных отложений при колебаниях от 1 до 17 мкг/г. Проанализировав изменения содержания хлорофилла по глубинам, можно сделать вывод об отсутствии связи между этими показателями. Доля феопигментов была достаточно высокой во всех пробах, что характерно для донных отложений на средних и больших глубинах озер. Данный показатель изменялся от 77 до практически 100 %. Для удельного содержания феопигментов в общем форбине также не выявлено зависимости по глубинам и не наблюдается корреляции с суммарным содержанием хлорофилла *a* (без поправки на присутствие феопигментов).

В 2017 г. нами проведено двукратное измерение хлорофилла *a* и феопигментов на озерах Нарочь и Мястро с целью отследить, как изменяются исследуемые показатели с течением времени. На оз. Нарочь в 80 % случаев при обработке проб после длительного хранения содержание хлорофилла уменьшалось (в среднем в 1,8 раза). Зависимости данного показателя от глубины отбора проб не выявлено. Минимальное значение по содержанию хлорофилла сразу после отбора составило 0,44 мкг/г, и оно практически не изменилось после хранения – 0,43 мкг/г (станция N9); максимальное значение в выборке (станция N12), наоборот, значительно снизилось – с 6,73 до 1,43 мкг/г соответственно. Среднее значение во всех образцах при определении сразу после отбора составило ($1,9 \pm 1,1$) мкг/г, после хранения – ($1,2 \pm 0,6$) мкг/г. На оз. Мястро наблюдали схожую ситуацию: содержание хлорофилла сразу после отбора проб и после хранения в большинстве проб снижалось, но в некоторых образцах после хранения отмечены более высокие значения (что может быть связано со структурной гетерогенностью донных отложений и попаданием в анализ навесок с более высоким содержанием пигментов). Содержание хлорофилла в первом случае колебалось от 0,25 до 5,3 мкг/г, после хранения – от 0,1 до 2,8 мкг/г. В среднем суммарное содержание хлорофиллов без поправки на присутствие феопигментов в донных грунтах оз. Мястро составило до хранения ($1,8 \pm 1,3$) мкг/г и после хранения ($1,6 \pm 1,4$) мкг/г. Доля феопигментов в общем форбине в озерах изменялась в пределах 80–100 %. Причем практически во всех исследованных пробах наблюдали увеличение доли феопигментов спустя 1,5 мес. хранения по сравнению с данными, полученными сразу после отбора проб (в среднем в 1,2 раза).

Таблица 2

**Физико-химические свойства донных отложений
оз. Нарочь и содержание в них хлорофилла, 2017 г.**

Table 2

**Physical and chemical properties of bottom sediments
of the lake Naroch and the content of chlorophyll, 2017**

Станция	Глубина станции, м	Содержание суммарного хлорофилла, мкг/г		Относительная влажность, %	Плотность, г/см ³	Органическое вещество, % в сухой массе
		Сразу после отбора проб	После хранения 1,5 мес.			
Трансекта 6						
N1	2,0	0,80	0,47	30,1 ± 0,3	2,04 ± 0,11	0,93 ± 0,77
N2	3,5	1,27	1,34	74,8 ± 0,8	1,26 ± 0,00	4,70 ± 0,05
N3	5,1	1,36	0,52	80,1 ± 1,1	1,05 ± 0,04	10,89 ± 0,08
N4	7,5	1,23	0,53	91,5 ± 3,8	1,14 ± 0,05	21,50 ± 0,43
Трансекта 7						
N5	2,2	1,20	0,97	32,4 ± 0,8	2,17 ± 0,04	0,95 ± 0,06
N6	4,3	0,63	0,78	71,0 ± 1,0	1,07 ± 0,01	6,12 ± 0,12
N7	6,2	3,63	2,45	82,5 ± 0,5	1,08 ± 0,01	4,24 ± 0,11
N8	8,0	2,65	1,91	89,4 ± 2,7	1,06 ± 0,03	23,26 ± 0,29
Трансекта 8						
N9	3,0	0,44	0,43	73,6 ± 5,5	1,22 ± 0,01	4,72 ± 1,01
N10	4,0	1,40	1,22	73,7 ± 1,9	1,08 ± 0,00	6,5 ± 1,10
N11	5,5	2,30	1,16	76,1 ± 0,3	1,04 ± 0,03	9,2 ± 0,80
N12	6,8	6,73	1,43	87,5 ± 0,4	1,10 ± 0,01	19,91 ± 0,27
N13	3,0	0,57	0,49	71,6 ± 0,5	1,26 ± 0,03	5,20 ± 0,20

Окончание табл. 2
Ending table 2

Станция	Глубина станции, м	Содержание суммарного хлорофилла, мкг/г		Относительная влажность, %	Плотность, г/см ³	Органическое вещество, % в сухой массе
		Сразу после отбора проб	После хранения 1,5 мес.			
Трансекта 9						
N14	2,0	1,15	0,74	80,1 ± 0,6	1,06 ± 0,02	7,38 ± 0,40
N15	4,0	1,56	2,04	82,0 ± 0,4	1,06 ± 0,02	9,67 ± 0,18
N16	5,0	2,77	1,82	87,4 ± 0,6	1,08 ± 0,01	20,6 ± 0,8
N17	8,0	2,33	1,23	89,8 ± 1,1	1,05 ± 0,01	24,98 ± 0,03

Таблица 3

Физико-химические свойства донных отложений оз. Мястро
и содержание в них хлорофилла, 2017 г.

Table 3

Physical and chemical properties of bottom sediments of the lake Myastro
and the content of chlorophyll, 2017

Станция	Глубина станции, м	Содержание суммарного хлорофилла, мкг/г		Относительная влажность, %	Плотность, г/см ³	Органическое вещество, % в сухой массе
		Сразу после отбора проб	После хранения 1,5 мес.			
Трансекта 1						
M1	3,1	1,50	0,80	70,9 ± 0,4	1,19 ± 0,01	5,31 ± 1,03
M2	4,7	5,30	3,88	76,6 ± 0,5	1,11 ± 0,02	7,34 ± 0,03
M3	5,6	2,18	2,17	81,6 ± 0,6	1,11 ± 0,01	10,84 ± 0,16
Трансекта 2						
M4	2,0	0,81	0,52	26,3 ± 0,4	2,03 ± 0,04	0,67 ± 0,13
M5	4,2	0,45	0,74	74,4 ± 2,2	1,15 ± 0,04	8,03 ± 1,38
M6	2,3	1,85	0,70	32,0 ± 1,0	1,89 ± 0,05	0,87 ± 0,06
Трансекта 3						
M7	3,6	1,40	1,10	76,0 ± 1,12	1,12 ± 0,04	6,09 ± 0,03
M8	4,5	1,46	1,89	77,1 ± 0,4	1,12 ± 0,03	7,64 ± 0,13
Трансекта 4						
M9	2,0	0,80	1,01	31,9 ± 1,7	1,88 ± 0,03	0,91 ± 0,04
M10	4,6	1,57	2,01	75,2 ± 0,6	1,07 ± 0,03	7,47 ± 0,22
M11	3,0	0,25	0,10	81,4 ± 0,7	1,04 ± 0,02	9,58 ± 1,43
Трансекта 5						
M12	1,9	2,50	2,57	29,9 ± 0,8	2,03 ± 0,07	0,93 ± 0,10
M13	4,5	2,65	2,80	79,2 ± 0,2	1,09 ± 0,01	7,42 ± 0,12

Пигментные индексы для индикации состояния водных экосистем на сегодняшний день используются редко, и в литературе содержится очень мало подобных сведений и методических рекомендаций, что усложняет возможность получить достоверные значения и провести их анализ. Для исследованных образцов донных отложений озер Нарочь и Мястро мы рассчитали известные из литературных источников пигментные индексы.

Исходя из анализа литературных источников [2; 5; 12; 14; 15] и наших данных, перспективных для получения информации о состоянии первичных продуцентов в водоемах, определены пигментные индексы E_{450}/E_{480} , E_{430}/E_{664} , E_{480}/E_{664} , E_{480}/E_{665} , $E_{480}/1,7E_{665K}$, E_{430}/E_{412} (табл. 4). Эти индексы рассчитываются

с помощью оптических плотностей ацетонового экстракта пигментов в областях длинно- и коротковолнового максимумов поглощения света хлорофиллом *a* (664; 665 и 430 нм) и коротковолновых максимумов для каротиноидов (430; 450 и 480 нм).

Таблица 4

Пигментные индексы донных отложений озер Нарочь и Мястро, 2016–2017 гг.

Table 4

The pigment indexes of bottom sediments of the lakes Naroch and Myastro, 2016–2017

Станция	E_{450}/E_{480}	E_{430}/E_{664}	E_{480}/E_{664}	E_{480}/E_{665}	$E_{480}/1,7E_{665к}$	E_{430}/E_{412}
S1	2,06	2,97	0,81	0,80	0,47	0,67
S3	1,54	2,65	1,27	1,25	0,80	0,80
S4	1,80	2,43	0,78	0,78	0,52	0,70
S7	1,93	2,42	0,69	0,68	0,47	0,62
S8	1,86	2,41	0,81	0,79	0,49	0,68
S9	1,42	2,71	1,44	1,41	0,90	0,72
S10	1,54	2,67	1,36	1,32	1,67	0,83
S11	1,42	2,76	1,44	1,42	0,67	0,70
S13	1,54	2,11	0,93	0,93	1,06	0,70
S14	1,56	3,24	1,47	1,46	0,87	0,76
S15	2,37	3,16	0,69	0,69	0,41	0,67
S16	2,41	2,65	0,60	0,60	0,40	0,67
S17	1,53	2,02	0,80	0,80	0,78	0,70
S18	1,76	3,14	1,14	1,15	0,72	0,70
S19	1,82	2,63	0,87	0,86	0,63	0,65
S20	1,61	2,33	0,86	0,86	0,66	0,78
S21	1,56	2,56	1,09	1,09	0,75	0,8
S22	1,95	2,62	0,84	0,84	0,75	0,71
S23	2,16	2,55	0,62	0,62	0,39	0,63
S24	1,77	2,48	0,83	0,82	0,28	0,66
S25	1,29	2,10	1,36	1,35	1,87	1,01
S26	1,44	2,46	1,28	1,26	0,88	0,8
S27	1,47	3,04	1,47	1,48	0,39	0,77
S28	1,27	1,44	0,88	0,86	2,78	0,81
S29	1,54	2,36	0,87	0,86	0,83	0,67
N1	1,32	3,51	2,46	2,46	0,46	1,05
N2	1,37	2,89	1,60	1,60	0,24	0,90
N3	1,44	3,18	1,73	1,77	0,07	0,86
N4	1,40	3,05	1,67	1,67	0,17	0,82
N5	1,29	5,36	3,29	3,37	0,38	0,97
N6	1,62	4,82	2,17	2,17	0,06	0,75
N7	1,56	3,53	1,76	1,74	0,42	0,75
N8	1,55	3,28	1,54	1,53	0,23	0,74
N9	1,38	4,80	3,13	3,36	0,24	0,84
N10	1,68	3,47	1,50	1,50	0,54	0,71
N11	1,49	3,13	1,59	1,59	0,31	0,73
N12	1,56	3,05	1,45	1,42	0,36	0,71

Окончание табл. 4
Ending table 4

Станция	E_{450}/E_{480}	E_{430}/E_{664}	E_{480}/E_{664}	E_{480}/E_{665}	$E_{480}/1,7E_{665k}$	E_{430}/E_{412}
N13	1,36	3,46	2,21	2,12	0,20	0,89
N14	1,42	2,73	1,47	1,45	0,17	0,74
N15	1,38	3,35	1,87	1,85	0,44	0,76
N16	1,50	2,94	1,43	1,41	0,48	0,70
N17	1,70	2,37	0,88	0,86	0,38	0,63
M1	1,34	4,00	2,69	2,69	0,37	0,89
M2	1,37	3,62	2,26	2,23	0,57	0,84
M3	1,27	4,74	3,46	3,47	0,69	0,87
M4	1,40	3,04	1,68	1,68	0,12	0,79
M5	1,45	3,16	1,63	1,63	0,10	0,71
M6	1,31	3,58	2,30	2,26	0,15	0,77
M7	1,49	5,35	2,96	2,91	0,63	0,79
M8	1,40	3,80	2,33	2,33	0,14	0,84
M9	1,39	4,59	2,77	2,91	0,14	0,81
M10	1,10	5,09	3,38	3,38	0,25	0,82
M11	0,84	3,08	3,08	3,08	0,04	0,77
M12	1,39	3,73	2,15	2,12	0,60	0,78
M13	1,36	3,82	2,27	2,21	0,82	0,77

Индекс E_{450}/E_{480} может быть использован как показатель степени развития различных отделов водорослей и цианобактерий. Согласно литературным данным [16] и собственным исследованиям значения указанного индекса выше 1 (1,14–14,6) характерны для дополнительных хлорофиллов и каротиноидов диатомовых и зеленых водорослей, а минимальные значения (около 1,0) характерны для желтых пигментов цианобактерий ввиду отсутствия хлорофиллов *b* и *c* и наличия специфических каротиноидов. В литературе [16] отмечается высокий коэффициент корреляции индекса E_{450}/E_{480} с долей цианобактерий в общей биомассе водорослей, что может быть использовано для выявления начальных этапов цветения водоемов. Это подтверждается нашими данными, полученными по р. Свислочи и ее водохранилищам в 2016 г., согласно которым существует обратная связь между значением индекса и степенью доминирования цианобактерий [17]. Для исследованных образцов донных отложений значение индекса E_{450}/E_{480} практически везде было больше 1,2 (1,27–2,41), что свидетельствует о доминировании пигментов зеленых и диатомовых водорослей. На двух станциях на оз. Мястро значение индекса было меньше 1,1, что говорит о наличии в этих образцах значительного количества пигментов цианобактерий. В целом для оз. Мястро средние значения индекса были ниже, что хорошо согласуется с литературными данными о более высоком содержании цианобактерий в составе фитопланктона этого озера по сравнению с оз. Нарочь [18].

Индексы E_{480}/E_{664} и E_{430}/E_{664} характеризуют соотношение общих каротиноидов и хлорофилла *a*. Считается, что повышение этих индексов свидетельствует об ухудшении физиологического состояния фитопланктона и увеличении его пигментного разнообразия [5; 16]. Если значение индексов ниже 1, то можно говорить о благоприятном состоянии водорослей, если пигментные индексы выше 1, то это свидетельствует о плохом физиологическом состоянии и снижении количества в фитопланктоне жизнеспособных активных клеток. По исследованным нами донным отложениям индекс E_{430}/E_{664} везде был выше 1 и изменялся от 2 до 5, что подтверждает отсутствие в донных отложениях значимого количества жизнеспособных клеток фитопланктона. Индекс E_{480}/E_{664} отражает баланс хлорофилла и каротиноидов в продуцентах водной экосистемы. В неблагоприятных условиях соотношение меняется в пользу каротиноидов. При этом отмечены более высокие значения для более трофного оз. Мястро.

Значения индекса E_{430}/E_{664} на всех исследованных станциях были в 2–3 раза выше, чем значения индекса E_{480}/E_{664} . Схожая ситуация наблюдалась при анализе спектральных индексов фитопланктона водоемов и водотоков, что позволяет предположить: баланс хлорофиллов и каротиноидов, характерный для фитопланктона, сохраняется и в донных отложениях. Значения индекса E_{430}/E_{664} не отличались для озер Нарочь и Мястро и составили в среднем $3,17 \pm 0,8$, в то время как индекс E_{480}/E_{664} в среднем был выше для оз. Мястро ($2,5 \pm 0,6$) по сравнению с оз. Нарочь ($1,4 \pm 0,6$).

Индексы E_{480}/E_{665} и $E_{480}/1,7E_{665к}$ также отражают соотношение каротиноидов и хлорофиллов. С помощью связи данных индексов с содержанием феопигментов можно оценить степень трансформации пигментов. При расчете индекса $E_{480}/1,7E_{665к}$ используется известное свойство хлорофилла уменьшать оптическую плотность при 665 нм в 1,7 раза в процессе превращения в феофитин под действием слабой кислоты. Слабая корреляция, прослеживаемая между этим индексом и удельным содержанием феопигментов в исследованных нами образцах, связана с тем, что везде хлорофилл в них разрушился в основном до феопигментов. Полученные данные по индексу $E_{480}/1,7E_{665к}$ были очень низкими (от 0,04 до 2,78) и в среднем в 1,9 раза меньше значения индекса E_{480}/E_{665} .

Таким образом, подчеркнем, что в литературе [1; 2; 16] встречаются 2 индекса – E_{480}/E_{664} и E_{480}/E_{665} , которые имеют почти аналогичные значения и характеристику. Так как пик хлорофилла *a* соответствует в длинноволновой области спектра длине волны 664 нм, то логичнее оставить для дальнейшего использования как в толще воды, так и в донных отложениях только индекс E_{480}/E_{664} . В нашем исследовании значения обоих индексов в 2016 г. изменялись от 0,6 до 1,5, в 2017 г. – от 0,8 до 3,4.

Еще один индекс E_{430}/E_{410} был предложен Б. Моссом [8] для анализа проб, содержащих большое количество феопигментов, однако мы предлагаем использовать скорректированный индекс E_{430}/E_{412} , поскольку в наших пробах максимум спектра поглощения в синей области приходится не на длину 410 нм, а на длину 412 нм. Этот индекс отображает изменения, которые происходят с молекулами хлорофилла при деградации, – сдвиг синего максимума спектра поглощения в более коротковолновую область. Соотношение оптических плотностей экстракта E_{430}/E_{412} соответствует соотношению хлорофиллов и феофитинов. В спектрах фитопланктона [12] во всех пробах значения светопоглощения на длине волны 430 нм были выше, чем на длине 412 нм. Значения индекса E_{430}/E_{412} , полученные для донных отложений наших озер, колебались от 0,62 до 1,05, следовательно, хлорофилл в пробах находился в основном в деградированном состоянии. Это подтверждается и данными по определению феопигментов в пробах, удельное содержание которых было 80–100 %.

Для контроля чистоты экстракта пигментов и правильности прописывания спектра светопоглощения нами были рассчитаны дополнительные индексы, предложенные ранее при расчете пигментных индексов фитопланктона разнотипных водных экосистем [12]. Мы выбрали несколько индексов, представленных в табл. 5. Индексы E_{664}/E_{720} , E_{430}/E_{720} и E_{412}/E_{720} показывают, во сколько раз длинно- и коротковолновые пики спектров поглощения хлорофилла *a* больше фонового значения чистоты экстракта (на 720 нм); при этом длине волны 664 нм соответствует максимальное поглощение хлорофилла *a* в длинноволновой области спектра, 430 нм – пик хлорофилла *a* в коротковолновой области спектра, 412 нм – максимальное значение для феофитина *a*.

Таблица 5

Пигментные индексы контроля чистоты экстракта донных отложений, 2016–2017 гг.

Table 5

The pigment indexes of control of the purity of the extract of bottom sediments, 2016–2017

Станция	E_{664}/E_{720}	E_{430}/E_{720}	E_{412}/E_{720}	E_{530}/E_{720}	E_{430}/E_{530}	E_{664}/E_{530}	E_{412}/E_{664}
S1	7,73	23,00	34,47	3,73	6,16	2,07	4,46
S3	7,89	20,89	26,06	3,39	6,16	2,33	3,30
S4	2,68	6,53	9,26	1,79	3,65	1,50	3,45
S7	8,67	21,00	33,75	3,42	6,15	2,54	3,89
S8	3,12	7,52	11,08	1,80	4,18	1,73	3,55
S9	4,56	12,36	17,24	2,52	4,90	1,81	3,78
S10	1,76	4,71	5,68	1,63	2,89	1,08	3,22
S11	12,90	35,60	50,60	6,30	5,65	2,05	3,92
S13	1,82	3,85	5,48	1,29	2,98	1,41	3,01
S14	3,64	11,78	15,44	2,67	4,42	1,36	4,24
S15	8,50	26,83	40,17	4,17	6,44	2,04	4,73
S16	6,86	18,14	27,00	3,00	6,05	2,29	3,94
S17	1,90	3,86	5,52	1,28	3,00	1,48	2,90
S18	11,00	34,60	49,40	5,20	6,65	2,12	4,49
S19	12,71	33,43	51,57	5,14	6,50	2,47	4,06

Окончание табл. 5
Ending table 5

Станция	E_{664}/E_{720}	E_{430}/E_{720}	E_{412}/E_{720}	E_{530}/E_{720}	E_{430}/E_{530}	E_{664}/E_{530}	E_{412}/E_{664}
S20	7,00	16,33	21,00	3,00	5,444	2,33	3,00
S21	2,28	5,84	7,34	1,68	3,48	1,36	3,22
S22	3,93	10,27	14,57	2,14	4,80	1,83	3,71
S23	9,08	23,17	36,58	3,58	6,46	2,54	4,03
S24	4,50	11,17	16,91	2,25	4,96	2,00	3,76
S25	1,10	2,32	2,29	1,36	1,70	0,81	2,08
S26	2,19	5,38	6,77	1,42	3,78	1,54	3,09
S27	11,50	35,00	45,50	5,00	7,00	2,30	3,96
S28	1,31	1,87	2,33	0,95	1,98	1,38	1,78
S29	2,89	6,84	10,21	2,32	2,95	1,25	3,53
N1	5,57	19,57	18,57	3,14	6,23	1,77	3,33
N2	12,00	34,75	38,50	4,50	7,72	2,67	3,21
N3	12,00	39,00	45,25	5,25	7,43	2,33	3,69
N4	7,20	22,00	26,80	3,40	6,47	2,12	3,72
N5	8,00	44,00	45,40	7,60	5,79	1,08	5,54
N6	8,50	41,00	54,50	4,00	10,25	2,12	6,41
N7	18,38	64,00	85,13	8,63	7,42	2,10	4,69
N8	26,00	84,50	114,75	11,25	7,51	2,29	4,46
N9	14,00	72,00	86,00	8,00	9,00	1,87	5,73
N10	38,00	132,00	185,00	16,00	8,25	2,37	4,87
N11	8,70	27,20	37,20	4,60	5,91	1,89	4,28
N12	28,25	84,62	118,50	11,50	7,36	2,41	4,27
N13	2,78	9,22	10,33	1,89	4,88	1,41	3,87
N14	5,60	15,00	20,40	2,90	5,17	1,89	3,71
N15	7,90	26,10	34,50	3,70	7,05	2,11	4,42
N16	17,25	50,00	71,50	7,25	6,90	2,35	4,21
N17	9,43	22,00	34,86	4,86	4,53	1,91	3,75
M1	7,57	30,28	34,00	4,43	6,84	1,71	4,49
M2	13,62	48,68	58,25	6,50	7,49	2,07	4,34
M3	14,50	68,75	79,25	9,00	7,64	1,61	5,47
M4	12,50	38,00	48,00	6,00	6,33	2,08	3,84
M5	9,50	30,00	42,50	5,00	6,00	1,90	4,47
M6	13,50	47,50	62,00	7,50	6,33	1,77	4,68
M7	8,83	46,33	58,83	5,50	8,42	1,58	6,79
M8	12,75	48,50	57,75	6,25	7,76	2,04	4,53
M9	3,50	16,83	20,83	3,00	5,61	1,22	5,68
M10	4,57	23,28	28,43	4,21	5,52	1,08	6,22
M11	2,00	6,17	8,00	1,83	3,36	1,09	4,00
M12	12,33	45,33	58,17	6,17	7,35	1,97	4,78
M13	14,60	54,20	70,00	7,80	6,95	1,82	4,93

Из табл. 5 видно, что во всех случаях значения индексов контроля чистоты экстракта больше 1. Наибольшее значение характерно для индекса E_{412}/E_{720} , что подтверждается максимальными данными по содержанию в пробах феофитинов.

Индекс E_{530}/E_{720} также используется для подтверждения правильности прописывания спектра. При длине волны 530 нм наблюдается спад спектра растительных пигментов ввиду того, что на этой волне

располагается переходная зона (зеленая и голубая), где практически нет светопоглощения, но значения индекса E_{530}/E_{720} здесь не должны быть ниже фонового значения 720 нм и, соответственно, указанный индекс не может быть ниже 1. Согласно полученным данным индекс E_{530}/E_{720} в среднем составил 6,5 (при колебаниях в диапазоне 1–16).

Индексы E_{430}/E_{530} и E_{664}/E_{530} показывают отношение содержания пика хлорофиллов a к величине спада в спектре поглощения. Значения этих индексов должны быть выше 1 и меньше значений индексов E_{664}/E_{720} , E_{430}/E_{720} .

Индекс E_{412}/E_{664} показывает, во сколько раз пик феофитина a в синей области спектра больше пика хлорофилла a в красной области. В настоящей работе по донным отложениям значение этого индекса в среднем составило 3,5 при колебаниях от 2,01 до 6,8.

Исходя из приведенных в табл. 5 индексов, определены нижние пороговые значения, позволяющие отбраковывать плохо прописанные спектры по критериям контроля чистоты экстракта. Так, для донных отложений предлагаются следующие нижние пороговые пределы пригодности пробы для анализа: $E_{664}/E_{720} - 2$, $E_{430}/E_{720} - 5$, $E_{412}/E_{720} - 5$, $E_{530}/E_{720} - 1,5$, $E_{430}/E_{530} - 3$, $E_{664}/E_{530} - 1,2$, $E_{412}/E_{664} - 2$.

Таким образом, проанализировав правильность прописанного спектра, можно сделать вывод о пригодности проб донных отложений для дальнейшего расчета пигментных индексов, отражающих важные характеристики первичных продуцентов в водоеме. После детального анализа спектров поглощения экстрактов пигментов донных отложений озер Нарочь и Мясстро некоторые пробы (S10, S13, S17, S25, S28, M11) оказались малопригодными для дальнейшего исследования и расчета пигментных индексов.

Спектральный анализ образцов донных отложений, проведенный на примере озер Нарочь и Мясстро, может оказаться ценным инструментом при изучении состояния водных объектов и качества воды.

Заключение

В результате проведенной работы проанализированы спектры поглощения в диапазоне длин волн 350–800 нм для донных отложений озер Нарочь и Мясстро. Установлено, что нет статистически значимой разницы между значениями светопоглощения на длинах волн 720 и 750 нм, что позволяет применять для анализа донных отложений более короткий спектральный ряд (аналогично ранее выполненной нами работе для фитопланктона).

В исследованных пробах отмечается высокая доля феопигментов в суммарном форбине (60–100 %). Содержание хлорофилла a (суммарного, без поправки на присутствие феопигментов) было невысоким: в 2016 г. в среднем оно составило 6,1 мкг/г, в 2017 г. – 1,85 мкг/г. Выявлено, что пробы должны быть обработаны сразу после их отбора или в течение нескольких дней после отбора, иначе количество хлорофилла снижается, а доля феопигментов возрастает и результаты становятся менее информативными.

Установлено, что нет связи между глубиной отбора донных отложений и содержанием в них хлорофилла a , а также удельным содержанием феопигментов в общем экстракте пигментов. Однако с глубиной снижается плотность донных отложений и закономерно увеличивается влажность и содержание органического вещества в сухой массе.

Проведены расчет пигментных индексов и оценка их значимости. Анализ пигментных индексов, отражающих физиологическое состояние фитопланктона, показал, что более информативными для работы с донными отложениями являются следующие: E_{450}/E_{480} , E_{480}/E_{664} , E_{430}/E_{664} , E_{430}/E_{412} . Предложены дополнительные индексы контроля чистоты экстракта, которые могут быть использованы как критерии качества исследуемой пробы. Для каждого индекса прописаны нижние пороговые значения.

Таким образом, пигментные индексы могут служить одним из интегральных параметров оценки качества воды, позволяющих проследить изменения в экосистемах вне зависимости от уровня их трофии и экологического состояния.

Библиографические ссылки

1. Сигарева ЛЕ, Тимофеева НА. Растительные пигменты в илах Иваньковского водохранилища как показатели деструкционных процессов. *Водные ресурсы*. 2003;30(3):346–356.
2. Сигарева ЛЕ. Хлорофилл в донных отложениях волжских водоемов. Москва: КМК; 2012.
3. Leavitt PR, Hodgson DA. Sedimentary Pigments. In: Smol JP, Birks HJ, Last WM (eds.) *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Volume 3: Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2006. p.295–325. DOI: 10.1007/0-306-47668-1_15.
4. Минеева НМ. *Растительные пигменты в воде волжских водохранилищ*. Москва: Наука; 2004.
5. Станиславская ЕВ. Пигментные характеристики перифитона озерно-речных систем урбанизированных территорий. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2016;18(2-2):502–506.
6. ГОСТ 17.1.04.02.90. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла a . Москва: ИПК Издательство стандартов; 2009.
7. СТБ 17.13.05-34. Охрана окружающей среды и природопользование. Аналитический контроль и мониторинг. Качество воды и определение концентрации хлорофилла a спектрофотометрическим методом. Минск: БелГИСС; 2014.

8. Moss B. A spectrophotometric method for the estimation of percentage degradation of chlorophylls to pheo-pigments in extracts of algae. *Limnology and Oceanography*. 1967;12(2):335–340. DOI: 10.4319/lo.1967.12.2.0335.
9. Бульон ВВ. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Ленинград: Наука; 1983.
10. *Determination of photosynthetic pigments in sea-water*. Monographs on Oceanologic Methodology. Paris: UNESCO; 1966. p.9–18.
11. Lorenzen CJ. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnology Oceanography*. 1967;12(2):343–346. DOI: 10.4319/lo.1967.12.2.0343.
12. Смольская ОС, Жукова АА. Спектральные пигментные индексы фитопланктона в разнотипных водных объектах Беларуси. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2018;1:113–123.
13. Мاستицкий СЭ. *Методическое пособие по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований*. Минск: Институт рыбного хозяйства; 2009.
14. Сигарева ЛЕ, Ляшенко ОА. Значимость пигментных характеристик фитопланктона при оценке качества воды. *Водные ресурсы*. 2004;31(4):475–480.
15. Сулимова ОС, Жукова АА, Адамович БВ. Оценка связи спектральных характеристик пигментного состава фитопланктона и вклада синезеленых водорослей в его общую биомассу. В: *Біологічні дослідження – 2014: збірник трудов V Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених і студентів, 4–6 квітня 2014, Житомир, Україна*. Житомир: Видавництво Житомирського державного університету ім. І. Франка; 2014. с.221–223.
16. Сиделев СИ, Бабаназарова ОВ. Анализ связей пигментных и структурных характеристик фитопланктона высокоэвтрофного озера. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2008;2(1):162–177.
17. Смольская ОС. Пигментные индексы, содержание сестона и хлорофилла *a* в русловых и зарегулированных участках р. Свислочь в районе г. Минска. В: *Биологическая осень – 2017: к Году науки в Беларуси: тезисы докладов Международной научной конференции молодых ученых, 9 ноября 2017, Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2017. с.218–220.
18. Жукова ТВ, Михеева ТМ, Ковалевская РЗ. *Бюллетень экологического состояния озер Нарочь, Мясстро, Баторино (2015 год)*. Минск: БГУ; 2016.

References

1. Sigareva LYe, Timofeyeva NA. Plant pigments in the Ivankovo reservoir silts as indicators of destruction processes. *Vodnyye resursy*. 2003;30(3):346–356 (in Russ.).
2. Sigareva LYe. *Khlorofill v donnykh otlozheniyakh volzhskikh vodoemov* [Chlorophyll in bottom sediments of Volga reservoirs]. Moscow: KMK; 2012 (in Russ.).
3. Leavitt PR, Hodgson DA. Sedimentary Pigments. In: Smol JP, Birks HJ, Last WM (eds.) *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Volume 3: Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2006. p.295–325. DOI: 10.1007/0-306-47668-1_15.
4. Mineyeva NM. *Rastitel'nye pigmenty v vode volzhskikh vodokhranilishch* [Vegetable pigments in the water of the Volga reservoirs]. Moscow: Nauka; 2004 (in Russ.).
5. Stanislavskaya EV. Pigment characteristics of periphyton at lake-river systems in urbanized territories. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*. 2016;18(2-2): 502–506 (in Russ.).
6. GOST 17.1.04.02.90. *Water. Spectrophotometric determination of chlorophyll a*. Moscow: IPK Izdatel'stvo standartov; 2009 (in Russ.).
7. STB 17.13.05-34. *Environmental protection and nature use. Analytical control and monitoring. Water quality. Spectrometric determination of the chlorophyll a concentration*. Minsk: BelGISS; 2014 (in Russ.).
8. Moss B. A spectrophotometric method for the estimation of percentage degradation of chlorophylls to pheo-pigments in extracts of algae. *Limnology and Oceanography*. 1967;12(2):335–340. DOI: 10.4319/lo.1967.12.2.0335.
9. Bul'on VV. *Pervichnaya produktiya planktona vnutrennikh vodoemov*. Leningrad: Nauka; 1983 (in Russ.).
10. *Determination of photosynthetic pigments in sea-water*. Monographs on Oceanologic Methodology. Paris: UNESCO; 1966. p.9–18.
11. Lorenzen CJ. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnology Oceanography*. 1967;12(2):343–346. DOI: 10.4319/lo.1967.12.2.0343.
12. Smolskaya VS, Zhukava HA. Spectral pigment indices of phytoplankton in different water objects of Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2018;1:113–123 (in Russ.).
13. Mastitskii SE. *Metodicheskoe posobie po ispol'zovaniyu programmy STATISTICA pri obrabotke dannykh biologicheskikh issledovaniy* [Methodological manual on the use of the STATISTICA program in the processing of biological research data]. Minsk: Institut rybnogo khozyaistva; 2009 (in Russ.).
14. Sigareva LE, Lyashenko OA. Significance of pigment characteristics of phytoplankton in water quality estimating. *Vodnyye resursy*. 2004;31(4):475–480 (in Russ.).
15. Sulimova OS, Zhukova AA, Adamovich BV. Otsenka svyazi spektral'nykh kharakteristik pigmentnogo sostava fitoplanktona i vklada sinezelenykh vodoroslei v ego obshchuyu biomassu [Evaluation of the relationship between the spectral characteristics of the phytoplankton pigment composition and the contribution of blue-green algae to its general biomass]. In: *Biologichni doslidzhennja – 2014: zbornik trudov V vseukrayns'koy naucho-praktycheskoy konferencyi molodykh uchennykh y studentov, 4–6 April 2014, Zhitomir, Ukraine*. Zhitomir: Zhytomyr Ivan Franko State University Publishing House; 2014. p.221–223 (in Russ.).
16. Sidelev SI, Babanazarova OV. Analiz svyazey pygmentnykh y strukturnykh kharakterystyk fytoplanktona vysokozytrofnoho ozero [Analysis of pigment and structural characteristics of phytoplankton in a highly eutrophic lake]. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2008;2(1):162–177 (in Russ.).
17. Smolskaya OS. Pigment indices and seston and chlorophyll *a* content in the Svisloch river and its reservoirs in Minsk city and suburbs. In: *Biologicheskaya osen' – 2017: k Godu nauki v Belarusi: tezisy dokladov Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchennykh, 9 noyabrya 2017, Minsk, Belarus*. Minsk: BSU; 2017. p.218–220 (in Russ.).
18. Zhukova TV, Mikheeva TM, Kovalevskaya RZ. *Byulleten' ekologicheskogo sostoyaniya ozer Naroch', Myastro, Batorino (2015 god)* [Bulletin of the ecological state of the lakes Naroch, Myastro, Batorino]. Minsk: BSU; 2016 (in Russ.).

УДК 630*165:630*44

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ ГЕНОВ *PINUS SYLVESTRIS*, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФИТОПАТОГЕННЫМ МИКРОМИЦЕТАМ

Л. В. МОЖАРОВСКАЯ¹⁾

¹⁾Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, 246001, г. Гомель, Беларусь

На основе данных высокопроизводительного секвенирования транскриптов проростков сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) были отобраны локусы, характеризующиеся наибольшим уровнем экспрессионной активности. Последующий анализ полученных результатов в базе данных GenBank NCBI позволил идентифицировать семейства генов, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам: гликозилгидролазы (GH19), белков теплового шока Hsp70 и Hsp90, антимикробных полипептидов (AMP), кальцийсвязывающих белков (CBP); ингибиторов альфа-амилазы, липидтранспортующих белков, запасных белков семян (AAI-LTSS). Также были идентифицированы два EST-маркера с неустановленной функцией, характеризующиеся высоким уровнем сходства с последовательностями ранее описанных генов устойчивости *PsACRE* и полипептидов, обладающих антигрибковой активностью (SS/AF).

Ключевые слова: сосна обыкновенная; высокопроизводительное секвенирование; транскриптом; гены устойчивости; фитопатогенные организмы.

FUNCTIONAL ANNOTATION OF GENES OF *PINUS SYLVESTRIS* ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PHYTOPATHOGENIC MICROMYCETES

L. V. MOZHAROVSKAYA^a

^aInstitute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus, 71 Praletarskaja Street, Gomel 246001, Belarus

On the basis of the obtained data of next generation sequencing of Scots pine seedlings transcripts, high expressed loci were selected. Analysis of the results obtained in the GenBank NCBI database made it possible to identify families of genes associated with resistance to phytopathogenic microorganisms: glycosylhydrolase (GH19), heat shock proteins Hsp70 and Hsp90, antimicrobial polypeptides (AMP), calcium-binding proteins (CBP); alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins, seed storage proteins (AAI-LTSS). Also, two EST markers with an unidentified function were identified, characterized by a high degree of similarity to the sequences of the previously described resistance genes *PsACRE* and polypeptides having antifungal activity (SS/AF).

Key words: scotch pine; next-generation sequencing; transcriptome; resistance genes; phytopathogenic organisms.

Образец цитирования:

Можаровская ЛВ. Функциональная аннотация генов *Pinus sylvestris*, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микромицетам. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018;2:78–84.

For citation:

Mozharovskaya LV. Functional annotation of genes of *Pinus sylvestris* associated with resistance to phytopathogenic micro-mycetes. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2018;2:78–84 (in Russ.).

Автор:

Людмила Валентиновна Можаровская – младший научный сотрудник сектора геномных исследований лаборатории генетики и биотехнологии.

Author:

Ludmila V. Mozharovskaya, junior researcher at the section of genomic research, laboratory of genetics and biotechnology. milamozh@yandex.ru

Введение

Среди биотических факторов, оказывающих негативное влияние на морфометрические и физиологические показатели посадочного материала сосны обыкновенной, выращиваемого в лесных питомниках, инфекционные болезни имеют первостепенное значение. Согласно литературным данным возбудителями фитозаболеваний в подавляющем большинстве выступают грибные организмы, реже – бактерии и вирусы [1].

Для противодействия патогенной инвазии у растений в ходе эволюции была сформирована сложная многоуровневая система защитных механизмов, индуцируемая посредством различных макромолекул белковой природы: внутриклеточных рецепторов (продукты *R*-генов (генов устойчивости)), распознающих эффекторных молекул паразита (продукты *Avr*-генов (генов авирулентности)); ферментов, связанных с образованием сигнальных молекул (жасмоновой кислоты, салициловой кислоты, этилена и др.), а также полипептидов, ассоциированных с процессами патогенеза (*PR*-белки) [2–4]. Эффективность реализации защитных механизмов, как правило, определяется способностью к регуляции растительным организмом экспрессионной активности генов, детерминирующих ответные реакции по отношению к фитопатогенным микроорганизмам.

Несмотря на наличие большого числа научных публикаций, посвященных изучению молекулярно-генетических механизмов устойчивости древесных растений к различным фитопатогенным микромикробам, применительно к хвойным видам большинство исследований связано с фрагментарным изучением отдельных локусов на постувеличных стадиях. Кроме того, представленные результаты часто носят разрозненный или противоречивый характер, что не позволяет сформировать единую концепцию и методологические подходы для анализа наследуемых факторов резистентности по отношению к патогенным грибам у видов рода *Pinus*.

Среди имеющихся работ, связанных с анализом генов, детерминирующих признак устойчивости у хвойных растений, можно выделить исследования Ж. Лю с соавторами и Б. Мейерса с соавторами [4; 5]. Указанными авторами на основе известных *R*-генов травянистых растений, относящихся к суперсемействам, детерминирующих полипептиды, содержащие функциональные нуклеотидсвязывающие (NBS) домены и С-концевые лейциннасыщенные повторы (LRR), идентифицированы их аналоги для *Pinus monticola* и *P. taeda*.

Не менее важными маркерами, характеризующими этапы инфекционного процесса и механизмы устойчивости, являются локусы, ассоциированные с патогенетическими реакциями. В целом по результатам проведенных молекулярно-генетических исследований среди *PR*-генов хвойных растений в наибольшей степени охарактеризованы: локусы, кодирующие литические ферменты, такие как β -1,3-глюканазы (семейство *PR*-2) и хитиназы (семейства *PR*-3, -4, -8, -11), участвующие в деградации клеточных стенок грибных микроорганизмов; тауматинподобные белки (семейство *PR*-5); группа ферментов пероксидаз лигнинообразующего типа, ассоциированных с формированием клеточной стенки (семейство *PR*-9); рибонуклеазы (семейство *PR*-10); растительные дефензины (семейство *PR*-12) [6].

Среди регуляторных механизмов для хвойных видов описаны сигнальные системы, основанные на секреции различных растительных гормонов: жасмонатов, салицилатов, фенилпропаноидов, что, в свою очередь, делает перспективным поиск локусов, связанных с метаболизмом данных соединений [7].

К настоящему времени в GenBank NCBI представлены только первичные данные секвенирования (WGS) сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) (автор К. Доннелли; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/FRDG00000000.1>) без проведения структурно-функциональной аннотации, что не позволяет напрямую применить указанные данные для выявления генов, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенам.

Цель данной работы – с помощью подходов сравнительной геномики выявить и идентифицировать в транскриптоме проростков сосны обыкновенной экспрессирующиеся гены, ассоциированные с устойчивостью к фитопатогенным микромикробам.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований являлись проростки *P. sylvestris* ($n = 14$), выращенные в лабораторных условиях при температуре воздуха 22 °C и фотопериоде 10 ч в течение 14 сут.

Выделение тотальной РНК проводили из корня и гипокоты проростков сосны обыкновенной с помощью набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (*Thermo Scientific*, США) по методике фирмы-производителя. Для очистки РНК от примесей геномной ДНК использовали набор DNase I (RNase-free) (*Thermo Scientific*, США), а для ингибирования рибонуклеаз – RNase Inhibitor (*Thermo Scientific*, США). Реакцию обратной транскрипции выполняли для матричной РНК (применяли праймер Oligo(dT)18) с получением двухцепочечной кДНК (набор Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit; *Thermo*

Scientific, США). Двухцепочечную кДНК очищали от сторонних примесей с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (*Beckman Coulter*, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Создание библиотек кДНК (ожидаемый размер фрагмента ≈ 200 п. н.) выполняли с помощью набора Ion Plus Fragment Library Kit (*Thermo Scientific*, США). Эмульсионную ПЦР проводили с использованием набора Ion PGM Template OT2 200 Kit (*Thermo Scientific*, США) согласно инструкции компании-производителя в планшетном амплификаторе Ion One Touch 2 System (*Thermo Scientific*, США). На этапе обогащения микросфер применяли автоматическую пробоподготовку Ion OneTouch ES и наборы Ion PGM Template OT2 Solutions 200 Kit и Ion PGM Enrichment Beads (*Thermo Scientific*, США). Реакцию секвенирования выполняли на основе платформы для секвенирования Ion PGM System и набора Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 (*Thermo Scientific*, США) с использованием полупроводникового микрочипа Ion 314 Chip v2 (*Thermo Scientific*, США). Данные, поступающие от геномного анализатора, первоначально обрабатывали в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения *Ion Torrent Suite* (*Thermo Scientific*, США).

Окончательную обработку информации и сборку транскриптов генов производили с использованием программного обеспечения *SeqMan Ngen v. 12* (*DNASTAR*, Израиль).

Результаты исследования и их обсуждение

На основании высокопроизводительного секвенирования библиотек кДНК проростков сосны обыкновенной с последующей сборкой первичных последовательностей (ридов) получено более 28 тыс. компилированных фрагментов (контигов), из которых было отобрано 150 с наибольшим значением параметра уровня покрытия, превышающим общеусредненный показатель в 20–130 раз. С использованием ISS-подхода (анализ сходства последовательностей) в базе данных нуклеотидных последовательностей и консервативных доменов GenBank NCBI идентифицирован перечень генов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционным заболеваниям семян сосны обыкновенной. Перечень локусов представлен в таблице. Расположение EST-маркеров соответствует порядку убывания экспрессионной активности.

EST-локусы, ассоциированные с устойчивостью
к инфекционным заболеваниям семян сосны обыкновенной
EST-loci associated with resistance to infectious diseases of Scots pine seedlings

Идентификационный номер контига	Структурно-функциональная принадлежность
19	Ген устойчивости <i>PsACRE</i>
11, 33	Ген, кодирующий белок с антигрибковой активностью (SS/AF)
45, 43	Ген антимикробного белка 1 (PpAMP1)
134	Ген, кодирующий белок дефензин (Def)
44	Ген антимикробного белка 4 (Sp-AMP4)
316, 196	Ген, кодирующий белок семейства AAI-LTSS
177	Ген, кодирующий хитиназу (GH19)
388	Ген, кодирующий белок-шаперон Hsp70
370	Ген, кодирующий белок кальмодулин (CaM)
944	Ген, кодирующий белок-шаперон Hsp90

Как следует из таблицы, среди идентифицированных генов наибольший уровень экспрессии отмечен у белоккодирующей последовательности (контиг № 19), характеризующейся 99 % степенью сходства с геном устойчивости *PsACRE P. sylvestris* (депонент GenBank AY423270.1), содержащим регион, детерминирующий лейциннасыщенные повторы (LRR) [8]. Последние являются составляющими элементами рецепторных белков, осуществляющих распознавание эффекторных белков патогенов [9]. Поиск в базе консервативных доменов CDD (Conservative Domain Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) выявил в составе контига № 19 наличие домена DUF761 с неустановленной функцией. Согласно литературным данным аналогичный домен у растительных организмов обнаружен в составе структурных белков CFE, экспрессирующихся в клетках волокон хлопчатника *Gossypium hirsutum* [10].

Среди последовательностей, относящихся к R-генам, в транскриптах проростков *P. sylvestris* идентифицированы локусы полипептидов, характеризующиеся антигрибковой активностью (SS/AF). Так, контиги № 11, 33 содержали белковый домен PF01657, ассоциированный с реакцией на солевой

стресс и обладающий фунгицидными свойствами. Структурно-функциональные свойства домена в литературе детально описаны для *Ginkgo biloba* [11; 12]. Структурной особенностью домена является наличие 6 консервативных цистеинов, связанных дисульфидными мостиками. Как правило, домен PF01657 представлен в комплексе с киназными доменами и зачастую дублируется в полипептидной цепи.

Проведенный анализ нуклеотидной структуры контигов № 45, 43, 134, 44 выявил их высокий уровень сходства с генами цистеиннасыщенных защитных антимикробных полипептидов (AMP). Эти белки характеризуются небольшим размером (менее 100 аминокислот) и на основе гомологии аминокислотных последовательностей, а также пространственной структуры классифицируются на следующие семейства: тионины, дефензины, хитинподобные белки, гевеино-нотииноподобные белки, неспецифические липидпереносящие белки (ЛПБ), макроциклические пептиды [13–15]. Контиги № 45, 43 и № 44 содержали домен MiAMP1 (один и два соответственно), описанный для антимикробного белка ореха *Macadamia integrifolia* [16]. Нуклеотидная последовательность контигов № 45, 43 была сходной на 97 % с последовательностью гена антимикробного белка 1 (PrAMP1) *Pinus pinaster* (депонент GenBank HM210085) [15]. Контиг № 44 на 98 % совпадал с последовательностью гена антимикробного пептида 4 (AMP4) семейства белков Sp-AMP *P. sylvestris* (депонент GenBank AF410955) [17]. Контиг № 134 на основании анализа доменов был идентифицирован как дефензин. Дефензины представляют собой низкомолекулярные цистеиннасыщенные полипептиды с антимикробными свойствами (AMP). Как правило, дефензины состоят из 45–54 аминокислотных остатков с постоянной структурой цистеинов, которые связаны четырьмя дисульфидными мостиками. Степень сходства данного контига с последовательностью гена дефензина *PsDef2 P. sylvestris* (депонент GenBank EF455617.1) составила 94 % [18]. Растительные дефензины относятся к группе PR-12 патогенезассоциированных белков с выраженной бактерицидной активностью. Согласно литературным данным большинство из них участвуют в формировании защитных реакций при холодовом стрессе, засухе, а также засолении [19–21].

Среди генов, ассоциированных с процессами патогенеза, нами были аннотированы гены (контиги № 316, 196), кодирующие белки, содержащие функциональные домены семейства AAI-LTSS. Данный домен у высших растений встречается в полипептидах разных групп, включая ингибиторы альфа-амилазы (AAI), липидтранспортующие белки (LT), запасные белки семян (SS) и др. Функциональные свойства домена AAI-LTSS связаны с защитными реакциями растений по отношению к насекомым и патогенам, переносом липидных молекул между внутриклеточными мембранами, а также с процессами роста и развития [22].

Контиг № 177 был аннотирован нами как ген гидролитического фермента хитиназы, относящейся к семейству 19 гликозилгидролаз (GH19) и катализирующей деградацию хитина посредством разрушения β -1,4-гликозидных связей N-ацетил-D-глюкозамина [23; 24].

Хитиназы растений относятся к группам (PR-3, -4, -8, -11) белков, ассоциированных с патогенезом, и представляют собой важный фактор резистентности по отношению к воздействию фитопатогенных микромицетов: защитная функция растительных хитиназ была продемонстрирована в значительном числе исследований. Например, в работе [25] у инфицированных *Fusarium spp.* проростков *P. elliotii* было показано индуцирование хитиназной активностью биосинтеза салициловой (для хитиназ I, II и IV классов) и жасмоновой кислот (для хитиназ I и IV классов), что указывает на основополагающую роль данного фермента в развитии системной устойчивости семян сосны.

Также в ходе исследования нами было идентифицировано два семейства белков теплового шока (белков-шаперонов) Hsp70 и Hsp90 (контиги № 388 и 944 соответственно). Согласно литературным данным белки семейства Hsp70 предотвращают межмолекулярную агрегацию полипептидов, участвуют в поддержании третичной структуры различных структурных и функциональных белков в условиях абиотического и биотического стресса. Кроме того, для них показана важная роль в процессах транслокации и транспорта белков [26]. Защитная функция белков Hsp70 продемонстрирована на примере инфицированных бактерией *Pseudomonas cichorii* растений *Nicotiana benthamiana* – как составляющий элемент сигнальной трансдукции формирования реакции сверхчувствительности [27]. Белок Hsp90 участвует в фолдинге, регулирует созревание и активацию многочисленных белков сигнальной трансдукции, клеточного цикла и транскрипции [28]. Описаны механизмы защиты растений от патогенов с участием Hsp90 и связанного с ним комплекса белков-кошаперонов: SGT1, RAR1, NLR [29; 30].

Контиг № 370 был функционально аннотирован как ген (*CaM*) кальмодулина – небольшого белка (16,7 кДа), обладающего кальцийсвязывающей активностью. Согласно исследованиям различных авторов при повышении уровня Ca^{2+} в растительной клетке происходит его хелатирование CaM-белком, что приводит к формированию модулирующего комплекса, оказывающего влияние на активность различных клеточных белков. Данный механизм лежит в основе большого числа ответных физиологических клеточных реакций на изменения условий окружающей среды. По существующим в настоящее

время данным, у растительных организмов выявлено более 50 типов белков, имеющих сайт связывания с кальмодулином [31]. В работе [32] описан механизм регуляции кальмодулином системной приобретенной устойчивости салицилатного типа у мутантной и контрольной линий *Arabidopsis thaliana*. У мутантных растений с деактивированным геном *AtSRI* было показано повышение уровня салициловой кислоты, что указывает на отрицательное влияние экспрессии гена *AtSRI* на устойчивость растений.

На основании полученных данных в целях проведения дальнейшего детального исследования устойчивости проростков сосны обыкновенной к фитопатогенным микроорганизмам был сформирован набор из 10 пар праймеров для скрининга и количественной оценки уровня экспрессии генов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционным заболеваниям.

Заключение

В результате проведенных исследований для транскриптома проростков сосны обыкновенной идентифицировано 10 генов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционным заболеваниям. На основе полученных данных разработан набор праймеров для проведения скрининга и анализа уровня экспрессии выявленных локусов.

Библиографические ссылки

1. Федоров НИ. Лесная фитопатология. Минск: БГТУ; 2004.
2. McDowell JM, Woffenden BJ. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(4):178–183. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00053-2.
3. Dong X, SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology*. 1998;1(4):316–323. DOI: 10.1016/S1369-5266(88)80053-0.
4. Liu JJ, Ekramoddoullah AKM. Isolation, genetic variation and expression of *TIR-NBS-LRR* resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Molecular Genetics and Genomics*. 2004;270(5):432–441. DOI: 10.1007/s00438-003-0940-1.
5. Meyers BC, Morgante M, Michelmore RW. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. *The Plant Journal*. 2002;32(1):77–92. DOI: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01404.x.
6. Bonello P, Gordon TR, Herms DA. Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: a novel hypothesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2006;68(4–6):95–104. DOI: 10.1016/j.pmpp.2006.12.002.
7. Davis JM, Wu H, Cooke JE. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular plant-microbe interactions*. 2002;15(4):380–387. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.4.380.
8. Li G, Asiegbu FO. Induction of *Pinus sylvestris* *PsACRE*, a homology of *Avr9/Cf-9* rapidly elicited defense-related gene following infection with root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *Plant science*. 2004;167(3):535–540. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.04.025.
9. Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 2007;45:289–306. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094331.
10. Yamamoto E, Baird WV. Three cotton fiber-expressed cDNAs (Accession Nos. AF072404, AF072405, and AF072406) (PGR 98–144). *Plant Physiology*. 1998;117(4):1525–1528. DOI: 10.1104/pp.117.4.1525.
11. Zhang L, Tian LH, Zhao JF. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*. 2009;149(2):916–928. DOI: 10.1104/pp.108.131144.
12. Sawano Y, Miyakawa T, Yamazaki H. Purification, characterization, and molecular gene cloning of an antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds. *Biological chemistry*. 2007;388(3):273–280. DOI: 10.1515/BC.2007.030.
13. Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM. Plant defense peptides. *Peptide Science*. 1998;47(6):479–491. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K.
14. Tam JP, Wang S, Wong KH. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*. 2015;8(4):711–757. DOI: 10.3390/ph8040711.
15. Canales J, Avila C, Canovas FM. A maritime pine antimicrobial peptide involved in ammonium nutrition. *Plant, cell and environment*. 2011;34(9):1443–1453. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02343.x.
16. McManus AM, Nielsen KJ, Marcus JP. MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a greek key β -barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins 1. *Journal of molecular biology*. 1999;293(3):629–638. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3163.
17. Asiegbu FO, Choi W, Li G. Isolation of a novel antimicrobial peptide gene (*Sp-AMP*) homologue from *Pinus sylvestris* (Scots pine) following infection with the root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *FEMS microbiology letters*. 2003;228(1):27–31. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00697-9.
18. Kovalyova VA, Gout RT. Molecular cloning and characterization of Scotch pine defending 2. *Cytology and genetics*. 2008;42(6):408–412. DOI: 10.3103/S0095452708060091.
19. Do HM, Lee SC, Jung HW, Hwang BK. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEFI*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science*. 2004;166(5):1297–1305. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.01.008.
20. Lacerda A, Vasconcelos EAR, Pelegrini PB. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:116. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00116.
21. Gaudet DA, Laroche A, Frick M. Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiologia Plantarum*. 2003;117(2):195–205. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00041.x.

22. Simoes M, Rodrigues A, de Vega Bartol J. Molecular characterization of pine embryogenesis: pursuing the role of a putative non-specific lipid-transfer protein. *BioMed Central*. 2011;5(7):71. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P71.
23. Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012;31(1):57–73. DOI: 10.1080/07352689.2011.616043.
24. Salzer P, Bonanomi A, Beyer K. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2000;13(7):763–777. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.7.763.
25. Davis JM, Wu H, Cooke JE. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular plant-microbe interactions*. 2002;15(4):380–387. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.4.380.
26. Wang W, Vinocur B, Shoseyov O. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*. 2004;9(5):244–252. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.03.006.
27. Kanzaki H, Saitoh H, Ito A. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular plant pathology*. 2003;4(5):383–391. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00186.x.
28. Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones*. 2001;6(3):238–246. DOI: 10.1379/1466-1268(2001)006<0238:THFOPI>2.0.CO;2.
29. Breiman A. Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Current Protein and Peptide Science*. 2014;15(3):232–244.
30. Takahashi A, Casais C, Ichimura K. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(20):11777–11782. DOI: 10.1073/pnas.2033934100.
31. AL-Quraan NA, Locy RD, Singh NK. Expression of calmodulin genes in wild type and calmodulin mutants of *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;48(8):697–702. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.04.011.
32. Du L, Ali GS, Simons KA. Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*. 2009;457(7233):154–1158. DOI: 10.1038/nature07612.

References

1. Fedorov NI. *Lesnaya fitopatologiya* [Forest Phytopathology]. Minsk: BG TU; 2004 (in Russ.).
2. McDowell JM, Woffenden BJ. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(4):178–183. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00053-2.
3. Dong X, SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology*. 1998;1(4):316–323. DOI: 10.1016/S1369-5266(88)80053-0.
4. Liu JJ, Ekramoddoullah AKM. Isolation, genetic variation and expression of *TIR-NBS-LRR* resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Molecular Genetics and Genomics*. 2004;270(5):432–441. DOI: 10.1007/s00438-003-0940-1.
5. Meyers BC, Morgante M, Michelmore RW. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *The Plant Journal*. 2002;32(1):77–92. DOI: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01404.x.
6. Bonello P, Gordon TR, Herms DA. Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: a novel hypothesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2006;68(4–6):95–104. DOI: 10.1016/j.pmpp.2006.12.002.
7. Davis JM, Wu H, Cooke JE. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular plant-microbe interactions*. 2002;15(4):380–387. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.4.380.
8. Li G, Asiegbu FO. Induction of *Pinus sylvestris* *PsACRE*, a homology of *Avr9/Cf-9* rapidly elicited defense-related gene following infection with root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *Plant science*. 2004;167(3):535–540. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.04.025.
9. Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 2007;45:289–306. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094331.
10. Yamamoto E, Baird WV. Three cotton fiber-expressed cDNAs (Accession Nos. AF072404, AF072405, and AF072406) (PGR 98–144). *Plant Physiology*. 1998;117(4):1525–1528. DOI: 10.1104/pp.117.4.1525.
11. Zhang L, Tian LH, Zhao JF. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*. 2009;149(2):916–928. DOI: 10.1104/pp.108.131144.
12. Sawano Y, Miyakawa T, Yamazaki H. Purification, characterization, and molecular gene cloning of an antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds. *Biological chemistry*. 2007;388(3):273–280. DOI: 10.1515/BC.2007.030.
13. Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM. Plant defense peptides. *Peptide Science*. 1998;47(6):479–491. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K.
14. Tam JP, Wang S, Wong KH. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*. 2015;8(4):711–757. DOI: 10.3390/ph8040711.
15. Canales J, Avila C, Canovas FM. A maritime pine antimicrobial peptide involved in ammonium nutrition. *Plant, cell and environment*. 2011;34(9):1443–1453. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02343.x.
16. McManus AM, Nielsen KJ, Marcus JP. MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a greek key β -barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins 1. *Journal of molecular biology*. 1999;293(3):629–638. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3163.
17. Asiegbu FO, Choi W, Li G. Isolation of a novel antimicrobial peptide gene (*Sp-AMP*) homologue from *Pinus sylvestris* (Scots pine) by two-dimensional infection with the root rot fungus *Heterobasidion annosum*. *FEMS microbiology letters*. 2003;228(1):27–31. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00697-9.
18. Kovalyova VA, Gout RT. Molecular cloning and characterization of Scotch pine defending 2. *Cytology and genetics*. 2008;42(6):408–412. DOI: 10.3103/S0095452708060091.
19. Do HM, Lee SC, Jung HW, Hwang BK. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEFI*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science*. 2004;166(5):1297–1305. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.01.008.

20. Lacerda A, Vasconcelos EAR, Pelegri PB. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:116. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00116.
21. Gaudet DA, Laroche A, Frick M. Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiologia Plantarum*. 2003;117(2):195–205. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00041.x.
22. Simoes M, Rodrigues A, de Vega Bartol J. Molecular characterization of pine embryogenesis: pursuing the role of a putative non-specific lipid-transfer protein. *BioMed Central*. 2011;5(7):71. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P71.
23. Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012;31(1):57–73. DOI: 10.1080/07352689.2011.616043.
24. Salzer P, Bonanomi A, Beyer K. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2000;13(7):763–777. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.7.763.
25. Davis JM, Wu H, Cooke JE. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular plant-microbe interactions*. 2002;15(4):380–387. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.4.380.
26. Wang W, Vinocur B, Shoseyov O. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*. 2004;9(5):244–252. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.03.006.
27. Kanzaki H, Saitoh H, Ito A. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular plant pathology*. 2003;4(5):383–391. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00186.x.
28. Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones*. 2001;6(3):238–246. DOI: 10.1379/1466-1268(2001)006<0238:THFOPI>2.0.CO;2.
29. Breiman A. Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Current Protein and Peptide Science*. 2014;15(3):232–244.
30. Takahashi A, Casais C, Ichimura K. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(20):11777–11782. DOI: 10.1073/pnas.2033934100.
31. AL-Quraan NA, Locy RD, Singh NK. Expression of calmodulin genes in wild type and calmodulin mutants of *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;48(8):697–702. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.04.011.
32. Du L, Ali GS, Simons KA. Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*. 2009;457(7233):154–1158. DOI: 10.1038/nature07612.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

УДК (577.118+581.132.1+631.813):633.11

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ РАСТЕНИЙ КАРБОКСИЛАТАМИ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПИГМЕНТЫ В ЛИСТЯХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

О. С. КАПИТАНСКАЯ¹⁾, Г. А. ПРЯДКИНА¹⁾, О. О. СТАСИК¹⁾

¹⁾Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
ул. Васильковская, 31/17, 03022, г. Киев, Украина

Проведено исследование влияния обработки растений микроэлементным комплексом на основе карбоновых кислот, созданным с помощью нанотехнологических методов, на пигментный комплекс различных сортов озимой пшеницы. Установлено, что обработка растений комплексом способствовала увеличению содержания хлорофиллов *a* и *b* и общих каротиноидов, по сравнению с контролем, на поздних фазах онтогенетического развития. Большую эффективность внекорневой обработки растений карбоксилатами микроэлементов наблюдали в год с засушливыми условиями в период налива зерна. Содержание обеих форм хлорофилла и их суммы в фазу молочно-восковой спелости зерна при таких условиях возросло на 13–19 %, каротиноидов – на 14–15 %, тогда как в год с лучшими условиями влагообеспеченности их концентрация повышалась на 4–8 и 7–12 % соответственно. Установлено также увеличение соотношения между содержанием хлорофиллов (*a* + *b*) и каротиноидов в условиях засухи. Это свидетельствует о том, что обработка растений микроэлементным комплексом способствовала продлению функционирования пигментного комплекса в репродуктивный период развития. В то же время не наблюдали существенных различий между обработанными и контрольными растениями по величине соотношения хлорофиллов *a* и *b*. То есть обработка растений карбоксилатами микроэлементов не влияла на стехиометрию между комплексами реакционных центров фотосистем и светособирающими комплексами фотосистемы II. Активация регуляторных механизмов у растений озимой пшеницы под действием исследуемого комплекса связана с наличием в его составе ряда важных микроэлементов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L.; комплекс микроэлементов; хлорофилл; каротиноиды; соотношение.

THE EFFECT OF FOLIAR APPLICATION OF MICROELEMENTS CARBOXYLATE ON PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN WINTER WHEAT LEAVES

O. S. KAPITANSKA^a, G. A. PRIADKINA^a, O. O. STASIK^a

^aInstitute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
31/17 Vasylkivska Street, Kyiv 03022, Ukraine

Corresponding author: O. S. Kapitanska (oskapitanska@gmail.com)

A study was made of the effect of foliar application of complex of microelements chelated on carboxylic acids, obtained using nanotechnology methods, on the pigment complex of various varieties of winter wheat. It was established

Образец цитирования:

Капитанская ОС, Прядкина ГА, Стасик ОО. Влияние обработки растений карбоксилатами микроэлементов на фотосинтетические пигменты в листьях озимой пшеницы. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;2:85–94.

For citation:

Kapitanska OS, Priadkina GA, Stasik OO. The effect of foliar application of microelements carboxylate on photosynthetic pigments in winter wheat leaves. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:85–94 (in Russ.).

Авторы:

Ольга Сергеевна Капитанская – аспирантка отдела физиологии и экологии фотосинтеза. Научный руководитель – Г. А. Прядкина.

Галина Алексеевна Прядкина – доктор биологических наук; старший научный сотрудник отдела физиологии и экологии фотосинтеза.

Олег Остапович Стасик – член-корреспондент НАН Украины, доктор биологических наук; заместитель директора по научной работе.

Authors:

Olga S. Kapitanska, postgraduate student at the department of physiology and ecology of photosynthesis.
oskapitanska@gmail.com

Galina A. Priadkina, doctor of science (biology); senior researcher at the department of physiology and ecology of photosynthesis.
galpryadk@gmail.com

Oleg O. Stasik, corresponding member of the National Academy of Sciences of Ukraine, doctor of science (biology); deputy director for science.

that the treatment of plants with the complex increased the content of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids in comparison with the control in the late phases of plants development. The high efficiency of foliar treatment of plants with carboxylates of microelements was observed in the year with arid conditions during the grain filling period. The content of both forms of chlorophyll and their amount during the phase of milk-waxy ripeness under such conditions increased by 13–19 %, carotenoids by 14–15 %, while in year with the best conditions of moisture supply their concentration, respectively, increased by 4–8 and by 7–12 %. An increase in the ratio of chlorophylls (*a* + *b*) to carotenoids under conditions of drought has also been established. This indicates that the foliar application of plants with a microelement complex contributed to the prolongation of the functioning of the pigment complex during the reproductive period of development. At the same time, not observed significant differences between treated and control plants in the ratio of chlorophylls *a* and *b*. Therefore, the treatment of plants with carboxylates of microelements did not affect on the stoichiometry between the complexes of the reaction centers of photosystems and light-harvesting complexes of photosystem II. Activation of regulatory mechanisms in winter wheat plants under the influence of microelements complex is associated with the presence in its composition of a number of important trace elements.

Key words: *Triticum aestivum* L.; complex of microelements; chlorophyll; carotenoids; ratio.

Введение

В литературе имеется много работ по исследованию значения микроэлементов и их участия в различных физиологических процессах растений [1–3], однако сведения об их влиянии на регуляторные механизмы начали появляться только в последние годы [4]. Исследования участия микроэлементов в активации регуляторных механизмов растений особенно актуальны в условиях изменения климата. Мало изучено также влияние низких концентраций микроэлементов на физиологические процессы. Актуальность этой проблемы обусловлена потребностью в уменьшении техногенной нагрузки на окружающую среду. В настоящее время наряду с традиционными хелатированными микроудобрениями появляются препараты нового поколения, созданные с использованием нанотехнологий, характеризующиеся более низкими дозами применения. В частности, созданный в Украине с помощью эрозивно-взрывной технологии микроэлементный комплекс «Аватар-1» содержит высокореакционные наночастицы металлов, хелатированные органическими кислотами [5].

Особая значимость изучения особенностей регуляции фотосинтетического аппарата растений обусловлена тем, что благодаря фотосинтезу образуется до 90 % массы сухого вещества. Основой для фотосинтетического преобразования энергии солнечного света в энергию химических связей является пигментный комплекс растений. Хлорофиллы поглощают фотоны света и передают энергию возбуждения в фотосинтетические реакционные центры [6–8]. Каротиноиды также могут выполнять светособирающую функцию в той области спектра, где не поглощают хлорофиллы, а в условиях избытка освещения выступают в качестве фотопротекторов [9].

Известно, что адаптация работы фотосинтетического аппарата на изменение условий освещения, которые могут значительно отличаться в течение дня вследствие движения солнца и метеорологических условий, осуществляется благодаря изменениям количества и соотношения пигмент-белковых комплексов в тилакоидных мембранах хлоропластов [10; 11]. Это связано с различными функциональными свойствами молекул хлорофилла, одни из которых входят в состав реакционных центров фотосистем, другие выполняют только светособирающую функцию [12]. Увеличение содержания каротиноидов связывают со старением или воздействием неблагоприятных факторов [13]. Поэтому сравнение соотношений форм хлорофиллов *a* и *b* и (или) их суммарного содержания к каротиноидам позволяет оценивать адаптационные способности фотосинтетического аппарата. Поскольку необходимым элементом современных технологий выращивания растений является применение микроэлементов, то исследование их влияния на фотосинтетический аппарат актуально для разработки биоэкологических технологий.

Одной из трех главных зерновых культур, которые составляют основу пищевого рациона человека, является пшеница [14]. Поиск путей увеличения производства зерна пшеницы становится особенно важным в условиях, наблюдаемых в последние десятилетия. В частности, это повышение температуры воздуха, а также увеличение продолжительности непрерывных периодов с высокой температурой, длительные грунтовые и воздушные засухи, ливневый характер осадков.

Цель данной работы – оценка влияния комплекса микроэлементов, полученных с помощью нанотехнологий, на содержание и соотношение фотосинтетических пигментов в листьях озимой пшеницы.

Материалы и методы исследований

Исследование проведено в полевых условиях на участках сортоиспытания Института физиологии растений и генетики НАН Украины (с. Глеваха, Васильковский район, Киевская область). Почвы на

участках светло-серые, оподзоленные, легкосуглинистые. Агротехника ухода за посевами – общепринятая для посевов озимой пшеницы в лесостепной агроклиматической зоне [15]. Нормы высева семян 5,5–6,0 млн зерен на гектар. За период вегетации было внесено 145 кг/га действующего вещества азота и по 90 кг фосфора и калия ($N_{145}P_{90}K_{90}$). Фенологические наблюдения за фазами развития растений выполняли по внешним морфологическим изменениям растений [16]. Учетная площадь каждой из четырех повторностей – 20 м². Учет урожая проводили методом прямого комбайнирования в 4-разовой повторности. Объектом исследований служили высокоурожайные сорта озимой пшеницы селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины и Мироновского института пшеницы имени В. М. Ремесла: Подолянка, Смуглянка, Астарт и Малиновка.

Для определения содержания фотосинтетических пигментов в каждом повторении отбирали по 20 побегов. Содержание хлорофиллов *a* и *b*, а также общих каротиноидов находили безмацерационным методом экстрагирования пигментов с последующим определением коэффициентов поглощения полученных растворов на спектрофотометре. Параллельно определяли содержание сухого вещества листьев и проводили пересчет содержания пигментов на грамм сухого вещества [17].

Внекорневую обработку растений микроэлементным комплексом «Аватар-1», полученным нанотехнологическими методами (ООО «Аватар», Украина), проводили в фазы выхода в трубку и начала колошения. В состав этого комплекса входят 7 наиболее важных для растительного метаболизма микроэлементов, хелатированных природными органическими кислотами [5]. Концентрация (по содержанию действующего вещества) магния составляла 0,05 %, железа и меди – 0,02, цинка – 0,003, марганца – 0,005, молибдена – 0,005, кобальта – 0,001 %. Хелатирующим лигандом служила лимонная кислота. Дозы применения микроэлементного комплекса «Аватар-1» в оба года исследований были одинаковыми и составляли 2 л/га в 2014 г. и 250 мл/га в 2016 г. в связи с тем, что производитель увеличил концентрацию препарата. Контролем служили растения, обработанные водой.

Метеорологические условия весенне-летней вегетации пшеницы в годы исследований значительно отличались между собой. Температура воздуха в апреле 2014 г. превышала средние многолетние значения на 1,0 °C, а в июне, наоборот, была меньше на 0,3 °C; в 2016 г. в эти месяцы она превышала норму на 3,1 и 2,1 °C соответственно. Отличительной чертой мая 2014 и 2016 гг. было значительно большее (в 2,6–3,0 раза) по сравнению с нормой количество осадков. Однако в июне 2016 г. сумма осадков составила только 18 % от нормы, а в 2014 г. – 66 %. Высокие значения гидротермического коэффициента, характеризующего естественную влагообеспеченность территории [18], свидетельствуют об избыточном увлажнении в мае 2014 и 2016 гг., а его наименьшее значение (0,25) в июне 2016 г. – о значительной засухе. Таким образом, влияние обработки растений было исследовано в годы с разными условиями в период налива зерна.

Статистическая обработка результатов проведена по Б. А. Доспехову [19] с использованием программ *Microsoft Excel*.

Результаты и их обсуждение

В 2014 г. содержание суммарного хлорофилла (*a* + *b*) в листьях озимой пшеницы сорта Смуглянка в фазу колошения как в контрольном, так и в опытном варианте составляло около 12 мг/г сухого вещества, однако у сорта Подолянка в эту фазу под действием обработки растений микроэлементным комплексом данная величина увеличивалась по сравнению с контролем на 1,4 мг/г сухого вещества (табл. 1). В две последующие фазы у сортов не наблюдали существенных различий по содержанию хлорофиллов между контрольными и опытными вариантами. В фазу молочно-восковой спелости содержание хлорофиллов (*a* + *b*) в вариантах с обработкой как у сорта Смуглянка, так и у сорта Подолянка превышало соответствующие значения контроля на 4–8 %. Обработка растений микроэлементным комплексом аналогично повлияла на количество общих каротиноидов. У сорта Подолянка в фазу колошения их содержание, по сравнению с контролем, возросло на 0,26 мг/г сухого вещества, а в фазу молочно-восковой спелости превышало соответствующие контрольные значения на 7–12 %. Таким образом, в 2014 г. положительное влияние обработки проявилось на поздних фазах онтогенетического развития растений. Следовательно, обработка растений комплексом микроэлементов, хелатированных карбоновыми кислотами, способствовала продлению функционирования фотосинтетического аппарата.

В 2016 г. содержание пигментов в листьях было ниже, чем в 2014 г. (см. табл. 1 и 2). В частности, в фазы цветения и молочно-восковой спелости содержание суммарного хлорофилла (*a* + *b*) в листьях сорта Смуглянка в 2014 г. было выше, чем в 2016 г., в 1,3–1,6 раза, а каротиноидов – в 1,2–2,5 раза. Это связано с метеорологическими особенностями указанных лет: большим количеством пасмурных дней и, соответственно, меньшей интенсивностью освещения в начале летней вегетации 2014 г. и большим

количеством ясных солнечных дней в 2016 г. В таких условиях содержание суммарного хлорофилла в фазу цветения в листьях озимой пшеницы сорта Смуглянка в варианте с обработкой растений составило ($10,06 \pm 0,40$) мг/г сухого вещества листа, в контрольном – ($8,90 \pm 0,32$) мг/г, у сорта Малиновка – ($7,55 \pm 0,18$) и ($6,62 \pm 0,09$) мг/г соответственно, у сорта Астарта – ($9,62 \pm 0,44$) и ($8,08 \pm 0,26$) мг/г сухого вещества (см. табл. 2). Достоверное увеличение содержания общих каротиноидов в эту фазу, по сравнению с соответствующими контрольными вариантами, установлено для сортов Малиновка и Астарта. В фазу молочно-восковой спелости, как и в 2014 г., содержание хлорофиллов в листьях растений, обработанных микроэлементным комплексом, превышало соответствующие контрольные значения. У всех сортов в вариантах с обработкой растений комплексом карбоксилатов металлов содержание обеих форм хлорофилла и их суммы возросло на 13–19 %, каротиноидов – на 14–15 %. Таким образом, в 2016 г. также сохранялось положительное влияние обработки на содержание хлорофилла в поздних фазах онтогенетического развития растений.

Таблица 1

Влияние обработки растений комплексом хелатированных микроэлементов (КХМ) на содержание фотосинтетических пигментов, мг/г сухого вещества, в листьях озимой пшеницы в отдельные фазы репродуктивного периода 2014 г.

Table 1

The effect of foliar application of complex of chelated microelements (CCM) on the photosynthetic pigments content, mg/g of dry matter, in winter wheat leaves in some phases of the reproductive period in 2014

Сорт	Вариант	Фаза			
		Колошение	Цветение	Молочная спелость	Молочно-восковая спелость
Содержание хлорофилла <i>a</i>					
Смуглянка	Контроль	9,17 ± 0,49	10,21 ± 0,08	7,24 ± 0,33	6,82 ± 0,07
	КХМ	9,54 ± 0,28	10,58 ± 0,31	7,57 ± 0,22	7,36 ± 0,13*
Подоянка	Контроль	12,70 ± 0,59	13,14 ± 0,19	7,84 ± 0,21	6,20 ± 0,17
	КХМ	13,87 ± 0,07*	13,38 ± 0,21	7,88 ± 0,13	6,39 ± 0,09*
Содержание хлорофилла <i>b</i>					
Смуглянка	Контроль	2,75 ± 0,23	2,96 ± 0,09	2,13 ± 0,12	1,87 ± 0,03
	КХМ	2,87 ± 0,13	3,00 ± 0,14	2,16 ± 0,10	2,00 ± 0,03*
Подоянка	Контроль	3,91 ± 0,23	3,92 ± 0,07	2,26 ± 0,12	1,81 ± 0,05
	КХМ	4,13 ± 0,03	4,04 ± 0,05	2,24 ± 0,06	1,92 ± 0,04*
Содержание хлорофиллов (<i>a + b</i>)					
Смуглянка	Контроль	11,92 ± 0,68	13,16 ± 0,17	9,36 ± 0,31	8,69 ± 0,10
	КХМ	12,41 ± 0,42	13,58 ± 0,44	9,73 ± 0,44	9,36 ± 0,15*
Подоянка	Контроль	16,61 ± 0,82	17,06 ± 0,20	10,10 ± 0,34	8,01 ± 0,18
	КХМ	18,01 ± 0,09*	17,42 ± 0,23	10,12 ± 0,19	8,32 ± 0,13*
Содержание общих каротиноидов					
Смуглянка	Контроль	4,54 ± 0,31	4,93 ± 0,02	1,60 ± 0,05	1,69 ± 0,05
	КХМ	4,46 ± 0,30	4,86 ± 0,09	1,70 ± 0,03	1,90 ± 0,03*
Подоянка	Контроль	3,77 ± 0,08	3,76 ± 0,02	1,71 ± 0,08	1,43 ± 0,03
	КХМ	4,03 ± 0,02*	3,80 ± 0,04	1,70 ± 0,04	1,53 ± 0,07*

* Разница между контрольным и опытным вариантами достоверна при $P < 0,05$.

Таблица 2

Влияние обработки растений комплексом хелатированных микроэлементов (КХМ) на содержание фотосинтетических пигментов, мг/г сухого вещества, в листьях озимой пшеницы в фазы цветения и молочно-восковой спелости в 2016 г.

Table 2

The effect of foliar application of complex of chelated microelements (CCM) on the content of photosynthetic pigments, mg/g of dry matter, in winter wheat leaves at anthesis and milk-waxy ripeness in 2016

Сорт	Вариант	Фаза	
		Цветение	Молочно-восковая спелость
Содержание хлорофилла <i>a</i>			
Смуглянка	Контроль	7,01 ± 0,28	4,31 ± 0,10
	КХМ	7,89 ± 0,28*	4,53 ± 0,14
Малиновка	Контроль	5,19 ± 0,06	4,22 ± 0,06
	КХМ	5,93 ± 0,17*	4,88 ± 0,09*
Астарта	Контроль	6,37 ± 0,19	4,77 ± 0,39
	КХМ	7,59 ± 0,35*	5,41 ± 0,24*
Содержание хлорофилла <i>b</i>			
Смуглянка	Контроль	1,89 ± 0,06	1,16 ± 0,04
	КХМ	2,18 ± 0,13*	1,21 ± 0,05
Малиновка	Контроль	1,43 ± 0,03	1,14 ± 0,03
	КХМ	1,61 ± 0,01*	1,30 ± 0,04*
Астарта	Контроль	1,71 ± 0,08	1,28 ± 0,09
	КХМ	2,03 ± 0,10*	1,43 ± 0,08*
Содержание хлорофиллов (<i>a + b</i>)			
Смуглянка	Контроль	8,90 ± 0,32	5,47 ± 0,11
	КХМ	10,06 ± 0,40*	5,75 ± 0,12*
Малиновка	Контроль	6,62 ± 0,09	5,36 ± 0,09
	КХМ	7,55 ± 0,18*	6,18 ± 0,13*
Астарта	Контроль	8,08 ± 0,26	6,05 ± 0,48
	КХМ	9,62 ± 0,44*	6,84 ± 0,32*
Содержание общих каротиноидов			
Смуглянка	Контроль	1,84 ± 0,11	1,37 ± 0,03
	КХМ	1,96 ± 0,07	1,39 ± 0,06
Малиновка	Контроль	1,41 ± 0,04	1,35 ± 0,01
	КХМ	1,55 ± 0,03*	1,55 ± 0,05*
Астарта	Контроль	1,63 ± 0,05	1,46 ± 0,11
	КХМ	1,86 ± 0,11*	1,66 ± 0,09*

* Разница между контрольным и опытным вариантами достоверна при $P < 0,05$.

Определенных закономерностей по величине соотношения хлорофиллов *a* и *b* в разные годы и в отдельные фазы онтогенеза не обнаружено. Средние значения варьировали от 3,3 до 3,8 в оба года испытаний (табл. 3 и 4). Величина этого соотношения в контрольных и опытных вариантах также несущественно отличалась для всех исследованных сортов в оба года вегетации.

Таблица 3

Влияние обработки растений комплексом хелатированных микроэлементов (КХМ) на соотношение фотосинтетических пигментов в листьях озимой пшеницы в отдельные фазы репродуктивного периода 2014 г.

Table 3

The effect of foliar application of complex of chelated microelements (CCM) on the ratio of photosynthetic pigments in winter wheat leaves in some phases of the reproductive period in 2014

Сорт	Вариант	Фаза			
		Колошение	Цветение	Молочная спелость	Молочно-восковая спелость
Соотношение хлорофиллов <i>a</i> и <i>b</i>					
Смуглянка	Контроль	3,36 ± 0,20	3,46 ± 0,08	3,41 ± 0,06	3,66 ± 0,13
	КХМ	3,33 ± 0,06	3,53 ± 0,06	3,51 ± 0,09	3,69 ± 0,02
Подоянка	Контроль	3,25 ± 0,04	3,35 ± 0,09	3,49 ± 0,10	3,43 ± 0,08
	КХМ	3,36 ± 0,10	3,31 ± 0,05	3,52 ± 0,04	3,32 ± 0,04
Соотношение содержания хлорофиллов и каротиноидов					
Смуглянка	Контроль	4,11 ± 0,12	4,17 ± 0,08	5,86 ± 0,18	5,14 ± 0,09
	КХМ	4,37 ± 0,17	4,38 ± 0,23	5,72 ± 0,09	5,15 ± 0,10
Подоянка	Контроль	4,41 ± 0,13	4,54 ± 0,03	5,93 ± 0,08	5,63 ± 0,06
	КХМ	4,47 ± 0,01	4,58 ± 0,07	5,94 ± 0,04	5,52 ± 0,20

Таблица 4

Влияние обработки растений комплексом хелатированных микроэлементов (КХМ) на соотношение фотосинтетических пигментов в листьях озимой пшеницы в фазы цветения и молочно-восковой спелости в 2016 г.

Table 4

The effect of foliar application of complex of chelated microelements (CCM) on the ratio of photosynthetic pigments in winter wheat leaves at anthesis and milk-waxy ripeness in 2016

Сорт	Вариант	Фаза	
		Цветение	Молочно-восковая спелость
Соотношение хлорофиллов <i>a</i> и <i>b</i>			
Смуглянка	Контроль	3,72 ± 0,12	3,73 ± 0,13
	КХМ	3,64 ± 0,10	3,73 ± 0,07
Малиновка	Контроль	3,67 ± 0,05	3,69 ± 0,05
	КХМ	3,74 ± 0,10	3,76 ± 0,05
Астарта	Контроль	3,74 ± 0,10	3,72 ± 0,11
	КХМ	3,73 ± 0,08	3,79 ± 0,07

Окончание табл. 4
Ending table 4

Сорт	Вариант	Фаза	
		Цветение	Молочно-восковая спелость
Соотношение содержания хлорофиллов и каротиноидов			
Смуглянка	Контроль	4,84 ± 0,13	4,00 ± 0,06
	КХМ	5,13 ± 0,05*	4,14 ± 0,04*
Малиновка	Контроль	4,69 ± 0,09	3,96 ± 0,08
	КХМ	4,87 ± 0,03*	3,99 ± 0,07
Астарта	Контроль	4,94 ± 0,03	4,17 ± 0,05
	КХМ	5,18 ± 0,06*	4,12 ± 0,11

* Разница между контрольным и опытным вариантами достоверна при $P < 0,05$.

Известно, что белки светособирающих комплексов фотосистемы I в тилакоидных мембранах хлоропластов связывают в 3–4 раза больше хлорофилла *a*, чем *b*, тогда как в светособирающих комплексах фотосистемы II обе формы содержатся примерно в одинаковом количестве [20; 21]. Считают, что соотношение хлорофиллов *a* и *b* косвенно характеризует соотношение между комплексами реакционных центров фотосистем I и II и размером периферической антенны фотосистемы II [22]. Отсутствие существенных различий между опытными и контрольными вариантами по величине соотношения хлорофиллов *a* и *b* свидетельствует о том, что обработка растений комплексом хелатированных микроэлементов не повлияла на стехиометрию между комплексами реакционных центров фотосистем и светособирающими комплексами фотосистемы II.

В 2014 г. не наблюдали существенного влияния обработок на соотношение содержания хлорофиллов (*a* + *b*) и каротиноидов (см. табл. 3), тогда как в 2016 г. указанная величина увеличивалась на 4–6 % в фазу колошения у всех сортов и в фазу молочно-восковой спелости у сорта Смуглянка (см. табл. 4). Это может быть обусловлено тем, что под влиянием обработки растений микроэлементами не увеличивалось содержание каротиноидов, которое, как считают, свидетельствует о неблагоприятных условиях [12; 13].

Таким образом, установлено, что обработка растений озимой пшеницы комплексом микроэлементов, хелатированных лимонной кислотой, способствовала продлению функционирования фотосинтетического аппарата. Об этом свидетельствует более высокое содержание суммарного хлорофилла на поздних этапах онтогенеза и увеличение соотношения содержания хлорофиллов (*a* + *b*) и каротиноидов. В то же время обработка не влияла на стехиометрию между комплексами реакционных центров фотосистем и светособирающими комплексами фотосистемы II.

Эффективность применения низких доз микроэлементов подтверждается в последние годы и многочисленными литературными источниками. Это связано с развитием нанотехнологий на современном этапе [23]. Так, выявлено положительное влияние внескорневой обработки растений нанохелатами цинка, железа и диоксида титана на урожай пшеницы [24] и ячменя [25]. В ряде работ установлено положительное воздействие нанокомплексов на пигментные показатели. В частности, показано увеличение содержания хлорофилла в листьях растений томатов под действием диоксида титана [26]. Также установлен рост содержания железа в листьях проростков кукурузы, выращенных на растворе с добавлением наночастиц оксида железа [27]. Имеются свидетельства высокой эффективности применения нанохелатов цинка и меди при стрессовых условиях, и выявлена сортоспецифичность их действия [28]. В то же время показано и негативное влияние отдельных наночастиц на фотосинтетические показатели. Так, применение наночастиц серебра, наоборот, уменьшало содержание хлорофилла в листьях овса [29] и гороха [30].

Основываясь на представленных данных, можно предположить, что низкие дозы применяемых микроэлементов могут не столько улучшать питание растений, сколько активировать их регуляторные механизмы. Базой для такого предположения служат работы многих исследователей. В частности, по данным М. Кобаяши и др. (М. Kobayashi et al.) [31], дефицит бора влиял на уровень экспрессии генов, связанных с окислительным стрессом. Авторы предполагают, что бор может действовать как сигнальная молекула и играть регуляторную роль благодаря более быстрой передаче сигнала от стенки клетки

в цитоплазму, которая может быть вовлечена в индукцию гена. Есть также свидетельства значительных различий экспрессии генов арабидопсиса при дефиците магния. Эти гены связаны с циркадным ритмом, синтезом этилена, фотозащитными системами фотосинтетического аппарата и процессами катаболизма хлорофилла. Поэтому действие магния может быть обусловлено активацией нескольких регуляторных механизмов. В пользу гипотезы о регуляторной роли микроэлементов (в частности, цинка) также свидетельствуют данные о повышении относительного уровня экспрессии двух антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и пероксидазы), четырех генов аскорбат-глутатионового цикла и двух генов, контролирующих синтез флавоноидов в обработанных цинком растениях в условиях засухи, по сравнению с контролем [32]. То есть в стрессовых условиях обработка растений цинком влияла на регуляцию нескольких антиоксидантных защитных систем на уровне транскрипции.

По данным наших предыдущих исследований, опрыскивание растений микроэлементным комплексом «Аватар-1» повышало активность антиоксидантных ферментов и урожайность озимой пшеницы. В отдельные фазы репродуктивного периода активность супероксиддисмутазы и аскорбат-пероксидазы флагового листка растений, обработанных микроэлементным комплексом, хелатированных лимонной и янтарной кислотами, увеличивалась на 24–60 % [33]. Урожайность сортов озимой пшеницы в вариантах с обработкой превышала соответствующие значения контрольных вариантов на 9–10 % в 2014 г. и на 7–9 % в 2016 г. [34].

Таким образом, положительное влияние обработки растений микроэлементным комплексом «Аватар-1» с невысокой концентрацией металлов-микроэлементов на пигментный комплекс, активность антиоксидантных ферментов, зерновую продуктивность различных сортов озимой пшеницы показывает, что действие этого комплекса связано с активацией регуляторных механизмов.

Заключение

Установлено, что обработка растений микроэлементным комплексом способствовала увеличению содержания фотосинтетических пигментов на поздних этапах онтогенеза при разных погодных условиях весенне-летней вегетации. Не выявлено влияния обработки на стехиометрию между комплексами реакционных центров фотосистем и светособирающими комплексами фотосистемы II. Активация регуляторных механизмов у растений озимой пшеницы под действием комплекса «Аватар-1» связана с наличием в его составе ряда важных микроэлементов, регуляторная роль которых уже установлена.

Библиографические ссылки

1. Marschner P. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. London: Academic Press; 2011.
2. Kumar A, Sebastian A, Prasad MNV, Malec P, Strzalka K. Functional tuning of photosynthetic pigments in response to trace elements. In: Golovko TK, Gruszecki WI, Prasad MNV, Strzalka K (eds.) *Photosynthetic pigments: chemical structure, biological function and ecology*. Syktyvkar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2014. p.356–381.
3. Zhang F, Chen J. A paradigm of nutrient management for fertilizer industry and global society. In: *XVII International Plant Nutrition Colloquium, 21–24 August 2017, Copenhagen, Denmark*. Copenhagen: University of Copenhagen faculty of science; 2017. p.79–80.
4. Verbruggen N, Hermans Ch. Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant and Soil*. 2013;368(1–2):87–99. DOI: 10.1007/s11104-013-1589-0.
5. Косінов МВ, Каплуненко ВГ. Спосіб отримання карбоксилатів металів. Нанотехнологія отримання карбоксилатів металів: пат. України на корисну модель № 38391; опубл. 12.01.2009. Бюл. № 1/2009.
6. Lichtenthaler HK. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes. *Methods in enzymology*. 1987;148: 350–382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
7. Бухов НГ, Бондарь ВВ, Дроздова ИС. Действие низкоинтенсивного синего и красного света на содержание хлорофиллов *a* и *b* и световые кривые фотосинтеза у листьев ячменя. *Физиология растений*. 1998;45(4):507–512.
8. Golovko T, Tabalenkova G. Pigments and productivity of the crop plants. In: Golovko TK, Gruszecki WI, Prasad MNV, Strzalka KJ (eds.) *Photosynthetic pigments: chemical structure, biological function and ecology*. Syktyvkar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2014. p.207–220.
9. Sun T, Yuan H, Cao H, Yazdani M, Tadmor Y, Li L. Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Molecular Plant*. 2018;11(1):58–74. DOI: 10.1016/j.molp.2017.09.010.
10. Тютерева ЕВ, Войцеховская ОВ. Реакции лишнего хлорофилла *b* мутанта ячменя chlorine 3613 на пролонгированное снижение освещенности. 1. Динамика содержания хлорофиллов, рост и продуктивность. *Физиология растений*. 2011; 58(1):3–11.
11. Dymova O, Fiedor L. Chlorophylls and their role in photosynthesis. In: Golovko T K, Gruszecki WI, Prasad MNV, Strzalka KJ (eds.) *Photosynthetic pigments: chemical structure, biological function and ecology*. Syktyvkar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2014. p.140–160.
12. Peter GF, Thornber GP. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem 2 light-harvesting pigment proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(25):16745–16754. PMID: 1885603.
13. Vermaas W. Molecular-biological approaches to analyze photosystem 2 structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1993;44:457–481. DOI: 10.1146/annurev.pp.44.060193.002325.

14. Reynolds MP, Rajaram S, Sayre KD. Physiological and genetic changes of irrigated wheat in the post-green revolution period and approaches for meeting projected global demand. *Crop Science*. 1999;39(6):1611–1621. DOI: 10.2135/cropsci1999.3961611x.
15. Моргун ВВ, Санін ЄВ, Швартау ВВ, Омеляненко ОА. *Клуб 100 центнерів. Сорти та технології вирощування високих урожаїв озимої пшениці*. Київ: Логос; 2011.
16. Куперман ФМ. *Морфофизиология растений*. Москва: Высшая школа; 1977.
17. Wellburn AP. The spectral determination of chlorophyll *a* and *b*, as well as carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 1994;144(3):307–313. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
18. Селянинов ГТ. Происхождение и динамика засух. В: *Засухи в СССР. Их происхождение, повторяемость и влияние на урожай*. Ленинград: Гидрометеиздат; 1958.
19. Доспехов Б. А. *Методика полевого опыта*. Москва: Колос; 1973.
20. Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991;1058(2):87–106. DOI: 10.1016/S0005-2728(05)80225-7.
21. Biswal AK, Pattanayak GK, Pandey SS, Leelavathi S, Reddy VS, Govindjee, et al. Light intensity-dependent modulation of chlorophyll *b* biosynthesis and photosynthesis by overexpression of chlorophyllide *a* oxygenase in tobacco. *Plant Physiology*. 2012; 159(1):433–449. DOI: 10.1104/pp.112.195859.
22. Eggink LL, Park H, Hooper JK. The role of chlorophyll *b* in photosynthesis: Hypothesis. *BMC Plant Biology*. 2001;1:450–465. DOI: 10.1186/1471-2229-1-2.
23. Indira TK, Lakshmi PK. Magnetic nanoparticles – a review. *Internatinal Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2010;3(3):1035–1042.
24. Habib M. Effect of foliar application of Zn and Fe on wheat yield and quality. *Journal of Biotechnology*. 2009;8(24):6795–6798. DOI: 10.4314/ajb.v8i24.68671.
25. Janmohammadi M, Sabaghnia N, Dashti Sh, Nouraein M. Investigation of foliar application of nano-micronutrient fertilizers and a nano-titanium dioxide on some traits of barley. *Biologija*. 2016;62(2):148–156. DOI: 10.6001/biologija.v62i2.3340.
26. Raliya R, Nair R, Chavalmane S, Wang WN, Biswas P. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics*. 2015;7(12):1584–1594. DOI: 10.1039/C5MT00168D.
27. Pariona N, Martinez AI, Hdz-García HM, Cruz LA, Hernandez-Valdesa A. Effect of hematite and ferrihydrite nanoparticles on germination and grown of maize seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;24(7):1547–1554. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.06.004.
28. Taran N, Storozhenko V, Svetlova N, Batsmanova L, Shvartau V, Kovalenko M. Effect of Zinc and Copper Nanoparticles on Drought Resistance of Wheat Seedlings. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12:60. DOI: 10.1186/s11671-017-1839-9.
29. Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Farzaneh M, Ghassempour A. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013;88:48–54. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.10.018.
30. Tripathi DK, Singh VP, Prasad SM, Chauhan DK, Dubey NK. Silicon nanoparticles (SiNp) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2015;96:189–198. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.07.026.
31. Kobayashi M, Mutoh T, Matoh T. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. IV. Genes induced under low boron supply. *Journal of Experimental Botany*. 2004;55(401):1441–1443. DOI: 10.1093/jxb/erh142.
32. Ma D, Sun D, Wang Ch, Ding H, Qin H, Hou J, et al. Physiological responses and yield of wheat plants in Zinc-mediated alleviation of drought stress. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:860. DOI: 10.3389/fpls.2017.00860.
33. Соколовська-Сергієнко ОГ, Прядкіна ГО, Капітанська ОС. Активність фотосинтетичного апарату та продуктивність озимої пшениці за обробки хелатованим мікродобривом і стимулятором росту. *Физиология растений и генетика*. 2015;47(4): 321–329.
34. Капітанська ОС, Прядкіна ГО, Стасик ОО. Вплив обробки рослин комплексом карбоксилатів мікроелементів на фотосинтетичні показники та врожай озимої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2017;48(3):248–255.

References

1. Marschner P. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. London: Academic Press; 2011.
2. Kumar A, Sebastian A, Prasad MNV, Malec P, Strzalka K. Functional tuning of photosynthetic pigments in response to trace elements. In: Golovko TK, Gruszecki WI, Prasad MNV, Strzalka K (eds.) *Photosynthetic pigments: chemical structure, biological function and ecology*. Syktyvkar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2014. p.356–381.
3. Zhang F, Chen J. A paradigm of nutrient management for fertilizer industry and global society. In: *XVII International Plant Nutrition Colloquium, 21–24 August 2017, Copenhagen, Denmark*. Copenhagen: University of Copenhagen faculty of science; 2017. p.79–80.
4. Verbruggen N, Hermans Ch. Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant and Soil*. 2013;368(1–2):87–99. DOI: 10.1007/s11104-013-1589-0.
5. Kosinov MV, Kaplunenko VG. Method for obtaining metal carboxylates. Nanotechnology for the production of metal carboxylates: Patent of Ukraine for Utility Model No. 38391; published 12.01.2009. Bulletin No. 1/2009 (in Ukrainian).
6. Lichtenthaler HK. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes. *Methods in enzymology*. 1987;148: 350–382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
7. Bukhov NG, Bondar' VV, Drozdova IS. Deistvie nizkointensivnogo sinego i krasnogo sveta na sodержanie khlorofillov *a* i *b* i svetovye krivye fotosinteza u list'ev yachmenya [The effect of low-intensity blue and red light on the content of chlorophylls *a* and *b* and the light curves of photosynthesis in barley leaves]. *Fiziologiya rastenii*. 1998;45(4):507–512 (in Russ.).
8. Golovko T, Tabalenkova G. Pigments and productivity of the crop plants. In: Golovko TK, Gruszecki WI, Prasad MNV, Strzalka KJ (eds.) *Photosynthetic pigments: chemical structure, biological function and ecology*. Syktyvkar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2014. p.207–220.
9. Sun T, Yuan H, Cao H, Yazdani M, Tadmor Y, Li L. Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Molecular Plant*. 2018;11(1):58–74. DOI: 10.1016/j.molp.2017.09.010.

10. Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. Responses of chlorophyll *b*-Free chlorina 3613 barley mutant to a prolonged decrease in illuminance. 1. Dynamics of chlorophyll content, growth, and productivity. *Fiziologiya rastenii*. 2011;58(1):3–11 (in Russ.).
11. Dymova O, Fiedor L. Chlorophylls and their role in photosynthesis. In: Golovko TK, Gruszecki WI, Prasad MNV, Strzalka KJ (eds.) *Photosynthetic pigments: chemical structure, biological function and ecology*. Syktyvkar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2014. p.140–160.
12. Peter GF, Thornber GP. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem 2 light-harvesting pigment proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(25):16745–16754. PMID: 1885603.
13. Vermaas W. Molecular-biological approaches to analyze photosystem 2 structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1993;44:457–481. DOI: 10.1146/annurev.pp.44.060193.002325.
14. Reynolds MP, Rajaram S, Sayre KD. Physiological and genetic changes of irrigated wheat in the post-green revolution period and approaches for meeting projected global demand. *Crop Science*. 1999;39(6):1611–1621. DOI: 10.2135/cropsci1999.3961611x.
15. Morgun VV, Sanin EV, Shvartau VV, Omeljanenko OA. Klub 100 centneriv. *Sorty ta tehnologii' vyroshhuvannya vysokyh urozhai'v ozymoi' pshenyci* [Club 100 centners. Varieties and technologies of growing high winter wheat crops]. Kiev: Logos; 2011 (in Ukrainian).
16. Kuperman FM. *Morfofiziologiya rastenii* [Plant morphophysiology]. Moscow: Vysshaya shkola; 1977 (in Russ.).
17. Wellburn AP. The spectral determination of chlorophyll *a* and *b*, as well as carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 1994;144(3):307–313. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
18. Selyaninov GT. Proiskhozhdenie i dinamika zasukh [The origin and dynamics of droughts]. In: Rudenko AI (eds.) *Zasukhi v SSSR. Ikh proiskhozhdenie, povtoryaemost' i vliyanie na urozhai*. Leningrad: Gidrometeoizdat; 1958 (in Russ.).
19. Dospekhov BA. *Metodika polevogo opyta* [Methodology of field experience]. Moscow: Kolos; 1973 (in Russ.).
20. Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991;1058(2):87–106. DOI: 10.1016/s0005-2728(05)80225-7.
21. Biswal AK, Pattanayak GK, Pandey SS, Leelavathi S, Reddy VS, Govindjee, et al. Light intensity-dependent modulation of chlorophyll *b* biosynthesis and photosynthesis by overexpression of chlorophyllide *a* oxygenase in tobacco. *Plant Physiology*. 2012; 159(1):433–449. DOI: 10.1104/pp.112.195859.
22. Eggink LL, Park H, Hooper JK. The role of chlorophyll *b* in photosynthesis: Hypothesis. *BMC Plant Biology*. 2001;1: 450–465. DOI: 10.1186/1471-2229-1-2.
23. Indira TK, Lakshmi PK. Magnetic nanoparticles – a review. *Internatinal Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2010;3(3):1035–1042.
24. Habib M. Effect of foliar application of Zn and Fe on wheat yield and quality. *Journal of Biotechnology*. 2009;8(24):6795–6798. DOI: 10.4314/ajb.v8i24.68671.
25. Janmohammadi M, Sabaghnia N, Dashti Sh, Nouraein M. Investigation of foliar application of nano-micronutrient fertilizers and a nano-titanium dioxide on some traits of barley. *Biologija*. 2016;62(2):148–156. DOI: 10.6001/biologija.v62i2.3340.
26. Raliya R, Nair R, Chavalmane S, Wang WN, Biswas P. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics*. 2015;7(12):1584–1594. DOI: 10.1039/C5MT00168D.
27. Pariona N, Martinez AI, Hdz-García HM, Cruz LA, Hernandez-Valdesa A. Effect of hematite and ferrihydrite nanoparticles on germination and grown of maize seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;24(7):1547–1554. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.06.004.
28. Taran N, Storozhenko V, Svetlova N, Batsmanova L, Shvartau V, Kovalenko M. Effect of Zinc and Copper Nanoparticles on Drought Resistance of Wheat Seedlings. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12:60. DOI: 10.1186/s11671-017-1839-9.
29. Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Farzaneh M, Ghassempour A. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013;88:48–54. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.10.018.
30. Tripathi DK, Singh VP, Prasad SM, Chauhan DK, Dubey NK. Silicon nanoparticles (SiNp) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2015;96:189–198. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.07.026.
31. Kobayashi M, Mutoh T, Matoh T. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. IV. Genes induced under low boron supply. *Journal of Experimental Botany*. 2004;55(401):1441–1443. DOI: 10.1093/jxb/erh142.
32. Ma D, Sun D, Wang Ch, Ding H, Qin H, Hou J, et al. Physiological responses and yield of wheat plants in Zinc-mediated alleviation of drought stress. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:860. DOI: 10.3389/fpls.2017.00860.
33. Sokolov's'ka-Sergienko OG, Pryadkina GO, Kapitans'ka OS. Aktyvnist' fotosyntetichnogo aparatu ta produktyvnist' ozymoi' pshenyci za obrobky helatovanym mikrodoobryvom i stymuljatorom rostu [The activity of the photosynthetic apparatus and the productivity of winter wheat for treatment with chelated micronutrient fertilizer and growth stimulator]. *Fiziologiya rastenii i genetika*. 2015; 47(4):321–329 (in Ukrainian).
34. Kapitans'ka OS, Pryadkina GO, Stasik OO. Vplyv obrobky roslyn kompleksom karboksylativ mikroelementiv na fotosyntetichni pokaznyky ta vrozhaj ozymoi' pshenyci [Influence of plant treatment with carboxylate complex of trace elements on photosynthetic indices and winter wheat harvest]. *Fiziologiya rastenii i genetika*. 2017;48(3):248–255 (in Ukrainian).

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

УДК 634.8:632.38:581.143.6(476)

МОРФОГЕНЕЗ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ СОРТОВ ВИНОГРАДА В КУЛЬТУРЕ *in vitro* ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Т. А. КРАСИНСКАЯ^{1), 2)}, А. А. ЗМУШКО¹⁾

¹⁾Институт плодоводства, ул. Ковалева, 2, 223013, агрогородок Самохваловичи, Минский район, Беларусь

²⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ,
ул. Долгобродская, 23, 220070, г. Минск, Беларусь

Изучено влияние биологически активных веществ синтетического происхождения (6-бензиладенин, тидиазурон и кинетин) на морфологическое развитие растений-регенерантов винограда сортов Агат донской и Mars на этапе микроразмножения. Наибольшим потенциалом к геммогенезу обладал сорт Mars. На средах с кинетином у сорта Mars отмечалось корнеобразование. На средах с тидиазурином у сорта Агат донской у основания конгломератов образовывался каллус. Тидиазурон и кинетин на 4-м пассаже вызывали увеличение доли витрифицированных растений от 52,8 до 59,8 % в зависимости от сорта. На 4-м и 5-м пассажах модифицированная питательная среда Мурасиге – Скуга с добавлением 6-бензиладенина в концентрациях 1,1 и 1,5 мг/л способствовала получению большего количества нормально развитых растений-регенерантов при геммогенезе, без негативных явлений, отмечающихся при использовании тидиазурина и кинетина. В среднем для изучаемых сортов применение модифицированной питательной среды Мурасиге – Скуга с 1,1 и 1,5 мг/л 6-бензиладенина способствовало активации геммогенеза, коэффициент размножения составил соответственно 4,3 и 4,7.

Ключевые слова: *Vitis* L.; 6-бензиладенин; тидиазурон; кинетин; культура *in vitro*; микроразмножение винограда.

Благодарность. Работа была выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б17-097).

MORPHOGENESIS OF GRAPE MICROPLANTS IN *in vitro* CULTURE USING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF SYNTHETIC ORIGIN

T. A. KRASINSKAYA^{a, b}, A. A. ZMUSHKO^a

^aInstitute for fruit growing, 2 Kavaliova Street, Samachvalavičy 223013, Minsk region, Belarus

^bInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

Corresponding author: T. A. Krasinskaya (krasinskaya@tut.by)

The aim of research was to study the influence of biologically active substances of synthetic origin (6-benzylaminopurine, thidiazuron and kinetin) on morphological development of microplants of cv. Agat donskoy and Mars on proliferation stage. Cv. Mars has the largest potential for gemmogenesis. On media with kinetin cv. Mars formed roots. On media with thidiazuron cv. Agat donskoy formed callus at base of conglomerate. Thidiazuron and kinetin on 4th subculture cause increase of percent of vitrified plants to 52.8–59.8 % depending on cultivar. During 4th and 5th subcultures modified MS

Образец цитирования:

Красинская ТА, Змушко АА. Морфогенез растений-регенерантов сортов винограда в культуре *in vitro* при использовании биологически активных веществ синтетического происхождения. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018;2:95–104.

For citation:

Krasinskaya TA, Zmushko AA. Morphogenesis of grape microplants in *in vitro* culture using biologically active substances of synthetic origin. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2018;2:95–104 (in Russ.).

Авторы:

Татьяна Анатольевна Красинская – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник отдела биотехнологии¹⁾; доцент кафедры общей биологии, экологии и экологической генетики²⁾.

Александр Александрович Змушко – кандидат сельскохозяйственных наук; научный сотрудник отдела биотехнологии.

Authors:

Tatiana A. Krasinskaya, PhD (biology); senior researcher at the department of biotechnology^a; associate professor at the department of general biology, ecology and ecological genetics^b. krasinskaya@tut.by

Alexandr A. Zmushko, PhD (agricultural sciences); researcher at the department of biotechnology. temlein2015@yandex.ru

culture with 1.1 and 1.5 mg/l BAP resulted in large number of normal developed microplants during gemmogenesis, without negative effects detected when using thidiazuron and kinetin. On average, for studied cultivars, use of modified MS culture with 1.1 and 1.5 mg/l BAP promoted activation of gemmogenesis, propagation coefficient was 4.3 and 4.7.

Key words: *Vitis* L.; 6-benzylaminopurine; thidiazuron; kinetin; *in vitro* culture; micropropagation of grape.

Acknowledgements. The work was performed with financial support of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project No. Б17-097).

Введение

На этапе микроразмножения межвидовых гибридов применяют модифицированные среды Мура-сиге – Скуга (MS) [1–6], Chee et al. (C₂D) [5; 6], содержащие в основном бензиламинопури-н (БАП) в качестве цитокинина в концентрациях от 0,1 до 5,0 мг/л [1–6]. В наших предыдущих исследованиях на примере сортов Платовский и Crystall не наблюдалось достоверной разницы в морфогенезе при использовании различного минерального состава модифицированных сред MS и C₂D [5]. Но многочисленные работы зарубежных коллег показывают, что эффективность микроразмножения определяется и гормональным составом, и генотипом растений.

Итальянские исследователи, изучая шесть сортов винограда: три генотипа Lambrusco (L. Salamino, L. Sorbara и L. Marani), Trebbiano modenese, Malbo gentile и Ancelotta, отметили, что использование невысокой концентрации БАП 0,55 мг/л способствовало элонгации растений-регенерантов, за исключением двух генотипов [6]. Также показано, что повышение концентрации БАП до 2,0 мг/л приводило к утолщению и снижению интенсивности роста основного побега, но способствовало интенсивному образованию адвентивных побегов у 15,0–32,8 % эксплантов [1]. Основным недостатком сред с повышенной концентрацией БАП являлось формирование небольших по длине междоузлий, что затрудняло дальнейшее черенкование побегов. Микропобеги, выращиваемые на среде с очень низкой концентрацией БАП (0,1 мг/л), развивались крайне медленно. Это, вероятно, связано с тем, что такие низкие концентрации препарата слабо стимулируют процессы органогенеза растений. Высокие же концентрации (5 мг/л) вызвали некроз тканей: верхушки чернели и гибли [2].

В [3] изучено влияние различных цитокининов (БАП, тидиазурон (TDZ), зеатин, 2-изопентиладе-нин (2iP) и кинетин), применяемых как по отдельности, так и в комбинации, на примере двух сортов винограда: Cabernet Sauvignon и Campbell Early. Установлено, что для этих генотипов максимальный коэффициент размножения (до 10,3) отмечался на среде с 2,2 мг/л БАП.

Добавление в среду только TDZ способствовало значительному увеличению сырой массы и форми-рованию каллуса, в то время как рост побегов был неудовлетворительным. Однако активация геммо-генеза определялась в первую очередь генотипом. Так, при комбинации TDZ и зеатина (5 µM : 5 µM) получали 9,9 растений-регенерантов сорта Campbell Early на эксплант, при комбинации БАП и зеатина максимальный коэффициент размножения 7,0 отмечался у сорта Cabernet Sauvignon [3].

Цель работы – изучить влияние биологически активных веществ синтетического происхождения (6-бензиладенин (6-БА), TDZ и кинетин) на морфогенез растений-регенерантов рода *Vitis* L. (сорта Агат донской и Mars) на этапе микроразмножения.

Материалы и методы исследований

Объекты исследований: Агат донской и Mars.

Агат донской – столовый сорт винограда ((Заря севера × Долорес) × Русский ранний); ВНИИВиВ имени Я. И. Потапенко, Россия. Морозоустойчив: –26 °С. Повышенно устойчив к милдью, серой гнили. Пригоден для выращивания в неукрывной культуре в районах укрывного виноградарства.

Mars – бессемянный виноград столового назначения, изабельный сорт. Генетическая формула: 25 % *Vitis vinifera* + 75 % *Vitis labrusca*. Морозоустойчивость: –25...–26 °С. Высокоустойчив к грибным за-болеваниям. Рекомендуются для беседочной культуры. Достаточно транспортабельный.

Питательная среда на этапе микроразмножения *in vitro*: модифицированная среда MS, содержа-щая различные концентрации 6-БА, кинетина и TDZ (табл. 1).

Показатели процесса микроразмножения:

- коэффициент размножения;
- доля витрифицированных растений, %;
- доля каллусообразования, %;
- доля растений с корнями, %;
- доля нормально развитых стерильных эксплантов, %.

Условия культивирования растений: освещение 2,5–3,0 тыс. лк (лампы Philips ЛД-54, 36W), температура +23...+25 °С, фотопериод 16/8 ч. Длительность культивирования 28 дней. Исследования проводили на пассажах 4 и 5.

Таблица 1

Гормональный состав питательных сред
на этапе микроразмножения

Table 1

Hormonal composition of nutrition medium
at the micropropagation stage

Обозначение среды	Биологически активные вещества	Концентрация, мг/л
MS1.1ba	6-БА	1,1
MS1.5ba	6-БА	1,5
MS2ba	6-БА	2,0
MS1.1kin	Кинетин	1,1
MS1.5kin	Кинетин	1,5
MS2kin	Кинетин	2,0
MS0.22tdz	TDZ	0,22
MS1.1tdz	TDZ	1,1
MS2tdz	TDZ	2,0

Статистическую обработку проводили в программе *Statistica 10.0*, используя ANOVA, одно- и многофакторный анализ, критерий Дункана для сравнения средних величин при $P = 0,95$. Одинаковые буквенные значения в строках или в столбцах означают недостоверность различий между средними величинами. Материал представлен в виде: среднее значение $\pm$ средняя статистическая ошибка.

Результаты и их обсуждение

Анализ данных показал, что эффективность этапа микроразмножения с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$) определялась генотипом растения, видом биологически активных веществ и выбранной его концентрацией в питательной среде.

Пассаж 4. Наибольший потенциал к геммогенезу отмечался у сорта Mars ($3,6 \pm 0,39$) и был почти в 2 раза выше, чем у сорта Агат донской ($1,9 \pm 0,13$) (табл. 2). В то же время 24,0 % конгломератов Mars были витрифицированы, у 4,2 % растений сорта Агат донской у основания конгломерата образовывался каллус.

Таблица 2

Развитие растений-регенерантов на средах с различными
биологически активными веществами на 4-м пассаже

Table 2

Regenerant development on mediums with different
biological active substances during 4th subculture

Сорт (фактор А)	Среда (фактор В)	Коэффициент размножения	Доля витрифицированных растений, %	Доля каллусообразования, %	Доля растений с корнями, %
Агат донской	MS1.1ba	$2,0 \pm 0,03h$	$0 \pm 0,00e$	$0 \pm 0,00c$	$0 \pm 0,00b$
	MS1.5ba	$3,1 \pm 0,03e$	$6,7 \pm 3,33e$	$0 \pm 0,00c$	$0 \pm 0,00b$
	MS2ba	$2,9 \pm 0,07f$	$33,3 \pm 0,00c$	$0 \pm 0,00c$	$0 \pm 0,00b$
	MS1.1kin	$1,5 \pm 0,03l$	$0 \pm 0,00e$	$0 \pm 0,00c$	$0 \pm 0,00b$
	MS1.5kin	$1,0 \pm 0,00m$	$0 \pm 0,00e$	$0 \pm 0,00c$	$0 \pm 0,00b$
	MS2kin	$1,0 \pm 0,00m$	$0 \pm 0,00e$	$0 \pm 0,00c$	$0 \pm 0,00b$
	MS0.22tdz	$1,8 \pm 0,06jk$	$58,9 \pm 4,85b$	$0 \pm 0,00c$	$0 \pm 0,00b$
	MS1.1tdz	$1,9 \pm 0,03j$	$23,3 \pm 3,33d$	$13,3 \pm 3,03b$	$0 \pm 0,00b$
	MS2tdz	$2,2 \pm 0,00g$	$51,5 \pm 1,5b$	$24,1 \pm 3,33a$	$0 \pm 0,00b$

Окончание табл. 2
Ending table 2

Сорт (фактор А)	Среда (фактор В)	Коэффициент размножения	Доля витрифицированных растений, %	Доля каллусообразования, %	Доля растений с корнями, %
Mars	MS1.1ba	5,6 ± 0,03b	7,0 ± 2,53e	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
	MS1.5ba	6,3 ± 0,03a	0 ± 0,00e	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
	MS2ba	6,3 ± 0,00a	0 ± 0,00e	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
	MS1.1kin	1,7 ± 0,00k	0 ± 0,00e	0 ± 0,00c	14,3 ± 0a
	MS1.5kin	1,1 ± 0,07m	0 ± 0,00e	0 ± 0,00c	12,2 ± 6,19a
	MS2kin	1,1 ± 0,00m	0 ± 0,00e	0 ± 0,00c	17,3 ± 3,90a
	MS0.22tdz	3,9 ± 0,07c	58,3 ± 4,17b	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
	MS1.1tdz	3,4 ± 0,07d	96,3 ± 3,70a	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
	MS2tdz	3,5 ± 0,03d	54,2 ± 4,17b	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
Среднее по фактору А					
Агат донской		1,9 ± 0,13b	19,3 ± 4,42b	4,2 ± 1,66a	0 ± 0,00b
Mars		3,6 ± 0,39a	23,9 ± 6,73a	0 ± 0,00b	4,9 ± 1,53a
Среднее по фактору В					
MS1.1ba		3,8 ± 0,79c	3,5 ± 2,23d	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
MS1.5ba		4,7 ± 0,72a	3,3 ± 2,11d	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
MS2ba		4,6 ± 0,77b	16,7 ± 7,45c	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b
MS1.1kin		1,6 ± 0,05e	0 ± 0,00d	0 ± 0,00c	7,2 ± 3,19a
MS1.5kin		1,0 ± 0,03g	0 ± 0,00d	0 ± 0,00c	6,1 ± 3,89a
MS2kin		1,1 ± 0,02g	0 ± 0,00d	0 ± 0,00c	8,6 ± 4,24a
MS0.22tdz		2,9 ± 0,48f	58,6 ± 2,86a	12,0 ± 5,55a	0 ± 0,00b
MS1.1tdz		2,7 ± 0,35d	59,8 ± 16,5a	6,7 ± 3,33b	0 ± 0,00b
MS2tdz		2,8 ± 0,28f	52,8 ± 2,07b	0 ± 0,00c	0 ± 0,00b

Биологически активные вещества с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$) оказывали влияние на морфогенез растений-регенерантов. Так, 6-БА способствовал активизации закладки в растения пазушных почек и их развития в конгломерате по сравнению с TDZ и кинетином. Максимальное значение коэффициента размножения отмечалось на среде с использованием 1,5 и 2,0 мг/л 6-БА и составляло 4,7 и 4,6 соответственно (см. табл. 2). Однако на питательной среде с 2,0 мг/л 6-БА 16,6 % конгломератов были витрифицированы, что является отрицательным явлением при микроразмножении.

Влияние TDZ и кинетина на морфогенез растений-регенерантов определялось генотипом. Только у сорта Агат донской TDZ в концентрациях 0,22 и 1,1 мг/л вызывал каллусообразование (см. табл. 2). Витрификация отмечалась у обоих изучаемых сортов. В среднем по сортам доля витрификации составила 52,8–59,8 %.

У сорта Mars кинетин вызывал корнеобразование: доля растений-регенерантов с корнями 12,2–17,3 %. В целом на среде с кинетином отмечался очень слабый геммогенез: коэффициент размножения в зависимости от концентрации варьировал от 1,0 до 1,7.

Таким образом, на 4-м пассаже модифицированная питательная среда MS с добавлением 6-БА в концентрациях 1,1 и 1,5 мг/л способствовала получению большего количества нормально развитых растений-регенерантов при геммогенезе, без негативных явлений, отмечающихся при использовании TDZ и кинетина.

Пассаж 5. Морфогенез растений-регенерантов на 5-м пассаже изучали на питательных средах, содержащих 6-БА в концентрациях 1,1; 1,5 и 2,0 мг/л и TDZ в концентрациях 0,22; 1,1 и 2,0 мг/л. Кинетин, как биологически активное вещество, был исключен из эксперимента в связи с низким результатом геммогенеза у обоих изучаемых сортов винограда. В ходе статистической обработки было отмечено высокодостоверное ($p < 0,001$) влияние генотипа растений, гормонального состава питательных сред и номера пассажа на морфогенез.

На 5-м пассаже, как и на 4-м, активность геммогенеза растений определялась генотипом. Наибольший потенциал к геммогенезу сохранился у сорта Mars, у которого коэффициент размножения в среднем по всем изучаемым средам составил 3,6, идентично показателю на 4-м пассаже (см. табл. 2 и 3). В то же время доля витрифицированных растений увеличилась почти в 2 раза по сравнению с 4-м пассажем и была высокой для обоих сортов независимо от генотипа: 56,7 % – у сорта Агат донской и 59,0 % – у сорта Mars.

Таблица 3

Влияние генотипа на морфогенез растений-регенерантов
на этапе микроразмножения на 5-м пассаже

Table 3

The influence of genotype on regenerant morphogenesis
at the micropropagation stage during 5th subculture

Сорт	Коэффициент размножения	Доля витрифицированных растений, %
Агат донской	$1,7 \pm 0,24b$	$56,7 \pm 10,14a$
Mars	$3,6 \pm 0,63a$	$58,9 \pm 8,91a$

По сравнению с 4-м пассажем на 5-м пассаже в среднем по всем изучаемым сортам отмечалось снижение коэффициента размножения на средах с высокой концентрацией 6-БА (2 мг/л) и на всех средах с TDZ (рис. 1).

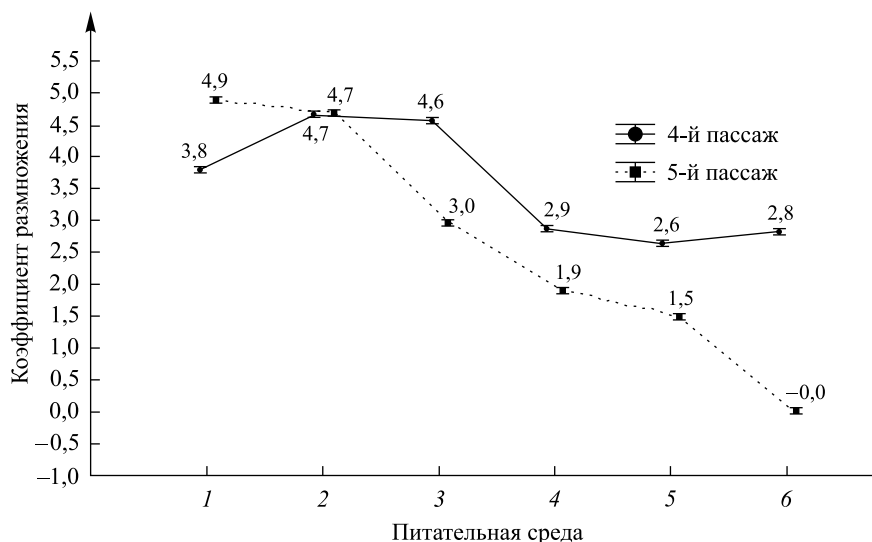


Рис. 1. Коэффициент размножения на 4-м и 5-м пассажах
в среднем по сортам Агат донской и Mars:

1 – среда MS + 1,1 мг/л 6-БА; 2 – среда MS + 1,5 мг/л 6-БА;
3 – среда MS + 2,0 мг/л 6-БА; 4 – среда MS + 0,22 мг/л TDZ;
5 – среда MS + 1,1 мг/л TDZ; 6 – среда MS + 2,0 мг/л TDZ

Fig. 1. Micropropagation rate during 4th and 5th subcultures
in average of cultivars Agat donskey and Mars:

1 – medium MS + 1.1 mg/l 6-BA; 2 – medium MS + 1.5 mg/l 6-BA;
3 – medium MS + 2.0 mg/l 6-BA; 4 – medium MS + 0.22 mg/l TDZ;
5 – medium MS + 1.1 mg/l TDZ; 6 – medium MS + 2.0 mg/l TDZ

Активация геммогенеза отмечалась только у сорта Mars под влиянием 6-БА в концентрации 1,1 мг/л, коэффициент размножения на этой среде составил 7,4, на 4-м пассаже данный показатель был 5,6 (рис. 2). У сорта Агат донской максимальное значение коэффициента размножения (2,9) на 5-м пассаже отмечалось на среде с 1,5 мг/л 6-БА, данная тенденция имела место и на 4-м пассаже. Но на этой среде увеличился показатель витрификации в 3,2 раза и доля витрифицированных конгломератов составила 21,2 % (табл. 4), в то время как на среде с 1,1 мг/л 6-БА коэффициент размножения достигал 2,3, а витрификации у растений не наблюдалось.

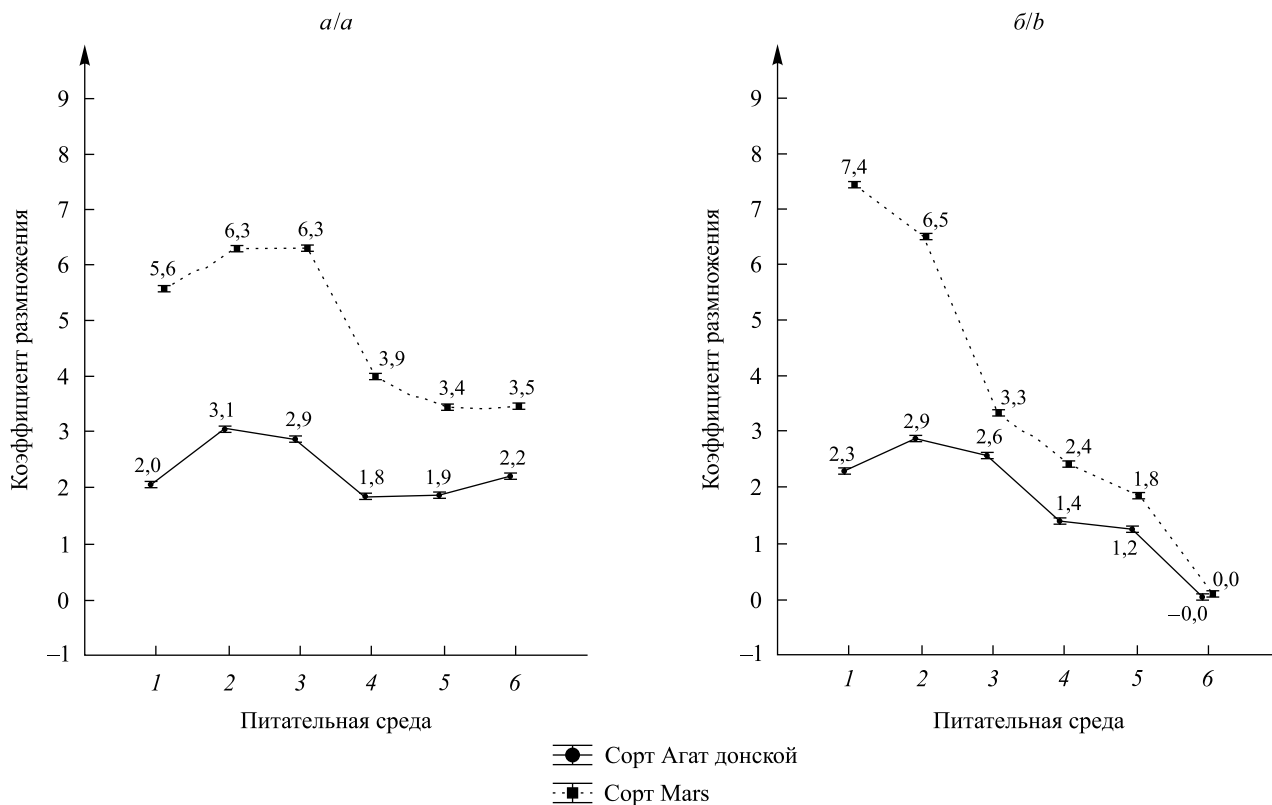


Рис. 2. Коэффициент размножения у сортов Агат донской и Mars на средах с различными биологически активными веществами на 4-м (а) и 5-м (б) пассажах:

1 – среда MS + 1,1 мг/л 6-БА; 2 – среда MS + 1,5 мг/л 6-БА;
3 – среда MS + 2,0 мг/л 6-БА; 4 – среда MS + 0,22 мг/л TDZ;
5 – среда MS + 1,1 мг/л TDZ; 6 – среда MS + 2,0 мг/л TDZ

Fig. 2. Micropropagation rate of cv. Agat donskoy and Mars on the mediums with different biological active substabces during 4th (a) and 5th (b) subcultures:

1 – medium MS + 1.1 mg/l 6-BA; 2 – medium MS + 1.5 mg/l 6-BA;
3 – medium MS + 2.0 mg/l 6-BA; 4 – medium MS + 0.22 mg/l TDZ;
5 – medium MS + 1.1 mg/l TDZ; 6 – medium MS + 2.0 mg/l TDZ

Таблица 4
Доля витрифицированных растений на 4-м и 5-м пассажах

Table 4

Vitrification percent during 4th and 5th subculture

Сорт	Пассаж	Гормональный состав сред	Доля витрифицированных растений-регенерантов, %
Агат донской	4	MS1.1ba	0 ± 0,00f
		MS1.5ba	6,7 ± 3,33f
		MS2ba	33,3 ± 0,00d
		MS0.22tdz	58,9 ± 4,85c
		MS1.1tdz	23,3 ± 3,33e
		MS2tdz	51,5 ± 1,50c
	5	MS1.1ba	0 ± 0,00f
		MS1.5ba	21,2 ± 3,03e
		MS2ba	26,2 ± 1,20de
		MS0.22tdz	100,0 ± 0,00a
		MS1.1tdz	92,6 ± 3,70a
		MS2tdz	100,0 ± 0,00a

Окончание табл. 4
Ending table 4

Сорт	Пассаж	Гормональный состав сред	Доля витрифицированных растений-регенерантов, %
Mars	4	MS1.1ba	7,0 ± 3,53f
		MS1.5ba	0 ± 0,00f
		MS2ba	0 ± 0,00f
		MS0.22tdz	58,3 ± 4,17c
		MS1.1tdz	96,3 ± 3,70a
		MS2tdz	54,2 ± 4,17c
	5	MS1.1ba	0 ± 0,00f
		MS1.5ba	26,7 ± 3,33de
		MS2ba	56,7 ± 3,33c
		MS0.22tdz	70,4 ± 3,70b
		MS1.1tdz	100,0 ± 0,00a
		MS2tdz	100,0 ± 0,00a

Витрификация рассматривается как негативное явление при микроразмножении. Увеличение доли витрифицированных растений в 7,2 раза на 5-м пассаже отмечалось даже на питательной среде с относительно невысокой концентрацией 6-БА – 1,5 мг/л (рис. 3). В среднем по сортам максимальная потеря растений от витрификации наблюдалась на средах с TDZ, доля витрифицированных конгломератов варьировала от 85,2 до 100,0 % в зависимости от концентрации TDZ (рис. 4 и 5).

Проанализировав морфогенез растений рода *Vitis* L. на примере сортов Агат донской и Mars, взяв за основу процессы, происходящие на 4-м и 5-м пассажах, можно сделать вывод о том, что для данных сортов использование модифицированной питательной среды MS с 1,1 и 1,5 мг/л 6-БА оптимально для активации геммогенеза и получения большого количества нормально развитых растений-регенерантов. Несмотря на то что коэффициент размножения был достоверно выше на среде с 1,5 мг/л 6-БА по сравнению с таковым на среде с 1,1 мг/л, доля витрифицированных растений на средах с более высокими концентрациями цитокинина в 8,5 раза была выше (рис. 6 и 7).

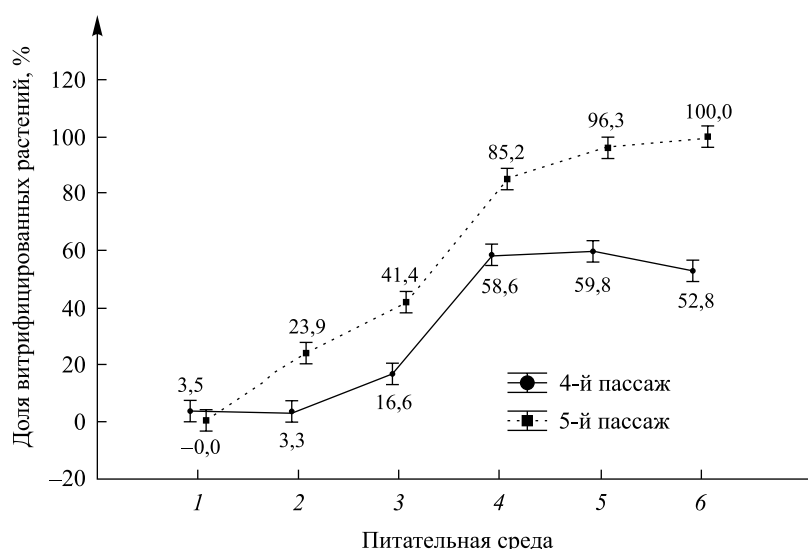


Рис. 3. Доля витрифицированных растений на 4-м и 5-м пассажах в среднем по сортам Агат донской и Mars: 1 – среда MS + 1,1 мг/л 6-БА; 2 – среда MS + 1,5 мг/л 6-БА; 3 – среда MS + 2,0 мг/л 6-БА; 4 – среда MS + 0,22 мг/л TDZ; 5 – среда MS + 1,1 мг/л TDZ; 6 – среда MS + 2,0 мг/л TDZ

Fig. 3. Vitrification percent of regenerants in average for cv. Agat donskey and Mars for two subcultures: 1 – medium MS + 1.1 mg/l 6-BA; 2 – medium MS + 1.5 mg/l 6-BA; 3 – medium MS + 2.0 mg/l 6-BA; 4 – medium MS + 0.22 mg/l TDZ; 5 – medium MS + 1.1 mg/l TDZ; 6 – medium MS + 2.0 mg/l TDZ

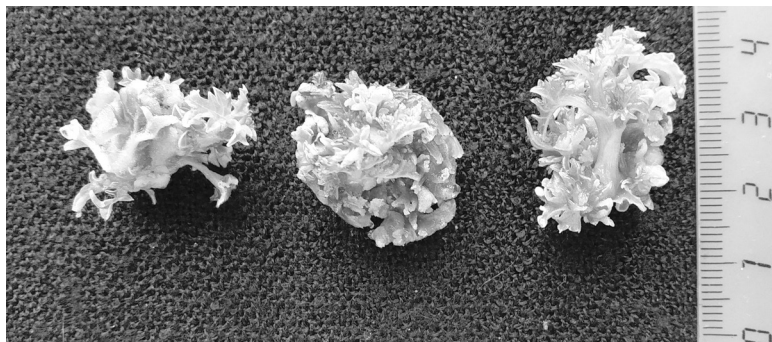


Рис. 4. Витрификация растений-регенерантов сорта Mars на среде MS + 2,0 мг/л TDZ на 5-м пассаже

Fig. 4. Plant vitrification on the medium MS + 2.0 mg/l TDZ during 5th subculture

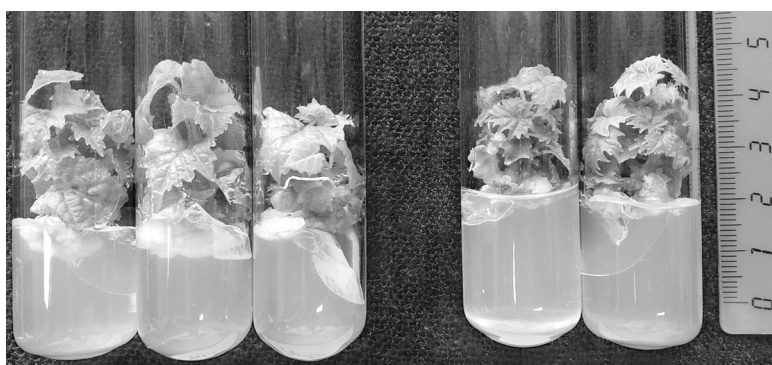


Рис. 5. Вид нормально развитых растений-регенерантов сорта Mars на 5-м пассаже на среде с 1,1 мг/л 6-БА

Fig. 5. The view of normal developed regenerants of cv. Mars on 5th subculture on the medium with 1.1 mg/l 6-BA

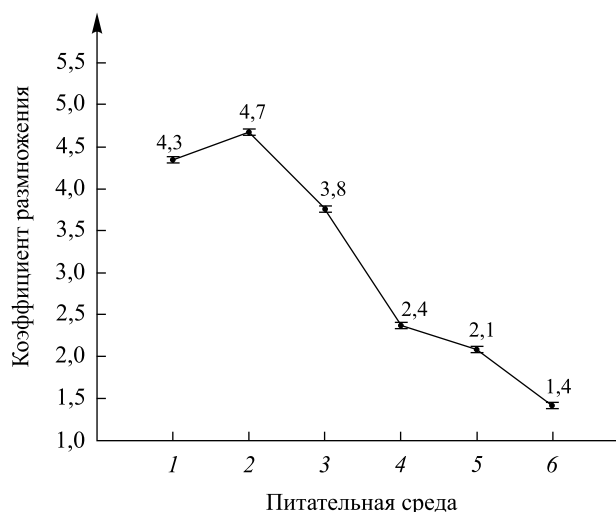


Рис. 6. Коэффициент размножения растений винограда Агат донской и Mars в среднем по двум пассажам:

1 – среда MS + 1,1 мг/л 6-БА; 2 – среда MS + 1,5 мг/л 6-БА;
3 – среда MS + 2,0 мг/л 6-БА; 4 – среда MS + 0,22 мг/л TDZ;
5 – среда MS + 1,1 мг/л TDZ; 6 – среда MS + 2,0 мг/л TDZ

Fig. 6. Micropropagation rate of cv. Agat donskoy and Mars in average for two subcultures:

1 – medium MS + 1.1 mg/l 6-BA; 2 – medium MS + 1.5 mg/l 6-BA;
3 – medium MS + 2.0 mg/l 6-BA; 4 – medium MS + 0.22 mg/l TDZ;
5 – medium MS + 1.1 mg/l TDZ; 6 – medium MS + 2.0 mg/l TDZ

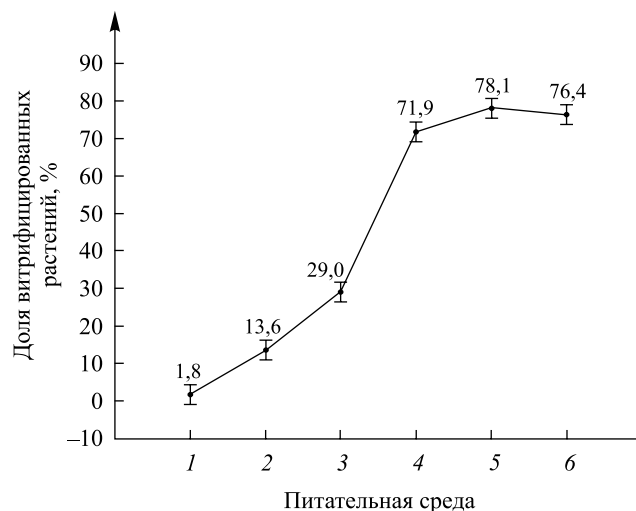


Рис. 7. Доля витрифицированных растений винограда Агат донской и Mars в среднем по двум пассажам:

1 – среда MS + 1,1 мг/л 6-БА; 2 – среда MS + 1,5 мг/л 6-БА;
3 – среда MS + 2,0 мг/л 6-БА; 4 – среда MS + 0,22 мг/л TDZ;
5 – среда MS + 1,1 мг/л TDZ; 6 – среда MS + 2,0 мг/л TDZ

Fig. 7. Vitrification percent of cv. Agat donskoy and Mars in average for two subcultures:

1 – medium MS + 1.1 mg/l 6-BA; 2 – medium MS + 1.5 mg/l 6-BA;
3 – medium MS + 2.0 mg/l 6-BA; 4 – medium MS + 0.22 mg/l TDZ;
5 – medium MS + 1.1 mg/l TDZ; 6 – medium MS + 2.0 mg/l TDZ

Закключение

Наибольшим потенциалом к геммогенезу обладал сорт винограда Mars. Данная тенденция сохранялась на двух изучаемых пассажах.

Отмечалось влияние генотипа на морфогенез растений-регенерантов при воздействии в среде различных биологически активных веществ: 6-БА, TDZ и кинетина. У сорта Mars на средах с кинетином наблюдалось образование корней, на среде с 0,22 мг/л TDZ – покраснение стеблей и листьев. У сорта Агат донской на средах с TDZ у основания конгломератов образовывался каллус.

TDZ и кинетин вызывали увеличение доли витрифицированных растений у обоих сортов, что является негативным при микроразмножении.

На 4-м и 5-м пассажах модифицированная питательная среда MS с добавлением 6-БА в концентрациях 1,1 и 1,5 мг/л способствовала получению большего количества нормально развитых растений-регенерантов при геммогенезе, без негативных явлений, отмечающихся при использовании TDZ и кинетина. В среднем для изучаемых сортов применение модифицированной питательной среды MS с 1,1 и 1,5 мг/л 6-БА способствовало активации геммогенеза, коэффициент размножения составил соответственно 4,3 и 4,7.

Библиографические ссылки

1. Бугаенко ЛО, Иванова-Ханина ЛВ. Морфогенез винограда в культуре *in vitro*. Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия: Биология, химия. 2011;24(63-2):73–82.
2. Батукаев АА, Эдиева Х, Батукаев МС. Биотехнологические методы ускоренного размножения винограда. Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ. 2013;1:271–275.
3. Kim S-H, Kim S-K. Effect of cytokinins on *in vitro* growth of grapes (*Vitis* spp.). *Journal of Plant Biotechnology*. 2002;29(2):123–127. DOI: 10.5010/JPB.2002.29.2.123.
4. Gray DJ, Klein CM. *In vitro* shoot micropropagation and plant establishment of «Orlando Seedless» grape and «Tampa» rootstock. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 1987;100:308–309.
5. Krasinskaya T, Kolbanova E. Grape viruses in Belarus. *Acta horticulture*. 2017;1188:307–311. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1188.40.
6. Enrico G, Imazio SA, Sgarbi E. *In vitro* propagation of Italian cultivars of *Vitis vinifera* and evaluation of genetic stability by SSRs markers. *Acta horticulture*. 2017;1155:165–172. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.23.

References

1. Bugaenko LO, Ivanova-Hanina LV. Morfogenez vinograda v kul'ture *in vitro* [Morphogenesis of grape in *in vitro* culture]. *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo. Seriya: Biologiya, khimiya*. 2011;24(63-2):73–82 (in Russ.).
2. Batukaev AA, Edieva H, Batukaev MS. Biotechnological methods of accelerated reproduction of grapes varieties. *Nauchnye trudy GNIISiV*. 2013;1:271–275 (in Russ.).
3. Kim S-H, Kim S-K. Effect of cytokinins on *in vitro* growth of grapes (*Vitis* spp.). *Journal of Plant Biotechnology*. 2002;29(2):123–127. DOI: 10.5010/JPB.2002.29.2.123.
4. Gray DJ, Klein CM. *In vitro* shoot micropropagation and plant establishment of «Orlando Seedless» grape and «Tampa» rootstock. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 1987;100:308–309.
5. Krasinskaya T, Kolbanova E. Grape viruses in Belarus. *Acta horticulture*. 2017;1188:307–311. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1188.40.
6. Enrico G, Imazio SA, Sgarbi E. *In vitro* propagation of Italian cultivars of *Vitis vinifera* and evaluation of genetic stability by SSRs markers. *Acta horticulture*. 2017;1155:165–172. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.23.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

МОДИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССОВ РОСТА
И НАБОРА БИОМАССЫ ПРОТОКОРМОВ
PHALAENOPSIS × *HYBRIDUM BLUME* В КУЛЬТУРЕ
in vitro ПОД ДЕЙСТВИЕМ БРАССИНОЛИДА И КАСТАСТЕРОНА

М. А. ЧЕРНЫШ¹⁾, Д. А. ПРЖЕВАЛЬСКАЯ¹⁾, И. А. ГОРСКИЙ¹⁾,
Д. В. КОЛБАНОВ²⁾, В. Н. ЖАБИНСКИЙ³⁾, В. А. ХРИПАЧ³⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Республиканское учебно-опытное унитарное предприятие БГУ «Щемяслица»,
ул. Жуковского, 15-А, 223049, агрогородок Щемяслица, Минская обл., Беларусь

³⁾Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
ул. Академика В. Ф. Купровича, 5, 220141, г. Минск, Беларусь

Брассиностероиды – класс стероидных регуляторов роста растений, обладающих сильным модифицирующим воздействием на ростовые процессы растений. Однако их влияние на рост культур *in vitro* орхидных, включая наиболее коммерчески важный род *Phalaenopsis*, к настоящему времени практически не изучено. Цель нашей работы – выявление особенностей воздействия брассинолида и кастастерона на рост протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum Blume* в культуре *in vitro*. В ходе проведенных опытов было показано, что обработка брассинолидом и кастастероном вызывает значительное увеличение прироста массы и длины протокормов. Стимулирующее воздействие брассиностероидов на рост протокормов наблюдалось начиная с их уровня в среде 10^{-10} моль/л. С ростом концентрации эффект брассиностероидов усиливался. При концентрации брассинолида 10^{-6} моль/л отмечался максимальный стимулирующий эффект – двукратное увеличение длины протокормов и увеличение их массы в 2,5 раза по сравнению с контролем. Полученные из обработанных брассиностероидами протокормов микрорастения демонстрировали большую длину корней (до 3 раз по сравнению с контролем; 10^{-7} моль/л брассинолида или

Образец цитирования:

Черныш МА, Пржевальская ДА, Горский ИА, Колбанов ДВ, Жабинский ВН, Хрипач ВА, Демидчик ВВ. Модификация процессов роста и набора биомассы протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum Blume* в культуре *in vitro* под действием брассинолида и кастастерона. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018; 2:105–113.

For citation:

Charnysh MA, Przhevalskaya DA, Horski IA, Kolbanov DV, Zhabinskii VN, Khripach VA, Demidchik VV. Brassinolide- and castasterone-induced modifications of growth processes and biomass accumulation in *in vitro* culture of *Phalaenopsis* × *hybridum Blume* protocorms. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:105–113 (in Russ.).

Авторы:

Мария Александровна Черныш – магистрант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Дарья Андреевна Пржевальская – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений биологического факультета.

Илья Андреевич Горский – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Дмитрий Викторович Колбанов – заместитель директора.

Владимир Николаевич Жабинский – доктор химических наук, доцент; главный научный сотрудник лаборатории стероидной химии.

Владимир Александрович Хрипач – доктор химических наук, профессор, академик НАН Беларуси; заведующий лабораторией химии стероидов.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Maryia A. Charnysh, master's degree student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. chernyshmaryia@gmail.com

Darya A. Przhevalskaya, junior researcher at the research laboratory of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

daryaprzhevalskaya@gmail.com

Ilya A. Horskii, student at the faculty of biology.

bio.gorskiy@bsu.by

Dmitrii V. Kolbanov, deputy director.

dmitry-kolbanov@tut.by

Vladimir N. Zhabinskii, doctor of science (chemistry), docent; chief researcher at the laboratory of steroid chemistry.

vz@ns.iboch.ac.by

Vladimir A. Khripach, doctor of science (chemistry), full professor, academician of the National Academy of Sciences of Belarus; head of the laboratory of steroid chemistry.

khripach@iboch.bas-net.by

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

кастастерона). На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что брассиностероиды обладают выраженным стимулирующим влиянием на рост и развитие важнейшего представителя декоративных орхидных *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в культуре *in vitro*. Схожими эффектами, согласно литературным данным, обладают ауксины, обычно рассматривающиеся в качестве антагонистов действия брассиностероидов на корневую систему.

Ключевые слова: *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume; брассиностероиды; семенное размножение; протокормы; культура *in vitro*.

BRASSINOLIDE- AND CASTASTERONE-INDUCED MODIFICATIONS OF GROWTH PROCESSES AND BIOMASS ACCUMULATION IN *in vitro* CULTURE OF *PHALAENOPSIS* × *HYBRIDUM* BLUME PROTOCOLS

M. A. CHARNYSH^a, D. A. PRZHEVALSKAYA^a, I. A. HORSKI^a,
D. V. KOLBANOV^b, V. N. ZHABINSKII^c, V. A. KHRIPACH^c, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bTeaching and Research Centre «Schemislitsa», Belarusian State University,
15-A Žukoŭskaha Street, Ščamyslica 223049, Minsk region, Belarus

^cInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5 Academician V. F. Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchik@bsu.by)

Brassinosteroids is a class of plant steroid hormones, which mainly targets growth, development and stress responses in higher plants. Nevertheless, their effects on the growth of orchid plants and orchid *in vitro* cultures, which are used in biotechnology, have not been studied in details. The objective of this work was to characterize effects of major brassinosteroids, such as brassinolide and castasterone, on the growth and development of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume protocorms *in vitro*. The obtained data show that both brassinolide and castasterone cause significant increase of the physical size and weight of *Phalaenopsis* protocorms. As low as 0.1 nmol · L⁻¹ of brassinolide and castasterone in the medium induced statistically significant stimulation of growth processes. 2–3-fold increase in biomass and length was induced by addition of 0.1–1.0 μmol · L⁻¹ of brassinolide and castasterone. Treatment by brassinosteroids increased the length of roots but did not change their quantity and developmental characteristics. Thus, results of this study clearly show that brassinosteroids are promising agents for regulation of orchid growth, which can act in extremely low concentrations and cause the pronounced stimulatory effects on growth but not on the development. Treatment by brassinosteroids as well as studying their effects on the physiological characteristics of ornamental orchids *in vitro* culture can potentially have an impact on the fundamental knowledge in the field of plant physiology and on the development of new biotechnologies.

Key words: *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume; brassinosteroids; seeds propagation; protocorms; *in vitro* culture.

Введение

Производство орхидей занимает лидирующие позиции в декоративном промышленном цветоводстве. Ежегодные продажи декоративных орхидей оцениваются в мире на уровне 1 млрд долл. США [1]. Наиболее популярными с коммерческой точки зрения родами являются *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Cymbidium* и *Cattleya*. Основными странами – производителями декоративных орхидей являются Китай, Германия, Япония, Нидерланды, Таиланд и США. В Беларуси производство орхидей не развито. В связи с этим представляет значительный интерес разработка технологий культивирования орхидей в целях их коммерциализации в нашей стране.

Для размножения орхидей в промышленных масштабах используют семена и микроклональное размножение [2]. Семенное размножение позволяет получить большое количество растений, но при этом их фенотипические признаки не контролируются. Данный недостаток отсутствует у микроклонального размножения, при котором сохраняются декоративные качества материнского растения, что особенно важно для гибридных форм [3; 4]. Однако микроклональное размножение дает в тысячи раз меньший выход растений.

Определяющим фактором контроля ростовых процессов и дифференцировки при культивировании *in vitro* является использование в среде фитогормонов, а также их соотношение. В большинстве случаев для контроля развития высших растений в асептической культуре применяются ауксины и цитокинины [5; 6], однако в последние годы появились данные, указывающие на возможность использования для биотехнологических манипуляций с культурами высших растений брассиностероидов (БС) [7; 8]. По ряду физиологических эффектов БС схожи с ауксинами: они модифицируют ростовые процессы, участвуют в дифференциации проводящих тканей и вызывают ряд других реакций [9; 10]. Помимо свойств, схожих с ауксинами, БС обладают уникальными характеристиками, такими как повышение устойчивости к стрессовым воздействиям [11; 12]. В ряде исследований показано прямое участие стероидных гормонов в активации экспрессии «протекторных» генов, связанных со стрессом [10–13]. Отмечается повышение активности антиоксидантных ферментов, уменьшение содержания активных форм кислорода и снижение общей проницаемости мембран проростков огурца [14]. Добавление в среду БС может стимулировать поддержание целостности фотосинтетического аппарата путем уменьшения его повреждения при световом и других типах стрессов [13].

Потенциальное воздействие БС на физиологические процессы у орхидных, включая биотехнологические аспекты культивирования *in vitro*, остается практически не изученным. В то же время для однодольных такие работы имеются. Например, продемонстрировано влияние данной группы фитогормонов на злаковые культуры, такие как рис, пшеница, ячмень и кукуруза [15–17]. Для злаков, в частности, показано, что уровень БС реагирует на возрастающую интенсивность абиотических стрессовых стимулов, а также изменяется у растений, взаимодействующих с бактериальными, грибковыми и вирусными инфекциями [13; 18]. Экзогенно введенные БС способны напрямую регулировать морфометрические параметры злаковых растений, такие как скорость роста, плодовитость, налив и созревание семян [13–18]. В связи с этим представляется возможным влияние БС на рост и развитие орхидей, в частности их культур, используемых в биотехнологических целях.

Для развития технологий размножения орхидей в Беларуси перспективным является размножение семенами в стерильных условиях через культуру стерильных протокормов [19]. Последние представляют собой уникальные по анатомии биполярные структуры орхидных, которые образуются сразу после прорастания семян [20]. У подавляющего количества представителей семейства Orchidaceae на первых этапах развития протокорм не дифференцирован на органы. Апикальная часть протокорма состоит из мелких клеток, представляющих собой апекс побега. Базальная его часть функционирует как «запасной орган», включает крупные паренхимные клетки и покрыта эпидермальными волосками [21]. Развитие зародыша в условиях *in vitro* сопровождается ростом апикальной зоны и значительными изменениями базальной. Для клеток базальной зоны характерны полиплоидия и многоядерность, что свидетельствует об их высокой метаболической активности. В условиях *in situ* данный процесс осуществляется с помощью мицелия гриба, гифы которого проникают в ткани зародыша [20].

Исследования влияния БС на рост и развитие протокормов ранее не проводились. В то же время протокормы играют критически важную роль в онтогенезе орхидных – крупнейшего семейства высших растений на планете (около 30 тыс. видов) [3]. Протокормы, формирующиеся при семенном размножении *in vitro*, могут послужить модельным объектом для изучения воздействия наиболее важных с точки зрения физиологии растений и потенциальной биологической активности БС на рост и развитие орхидных.

Цель настоящей работы – выявление особенностей воздействия важнейших БС: брассинолида и кастастерона – на ростовые процессы у протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в культуре *in vitro*. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи: адаптировать и оптимизировать протоколы получения культуры *in vitro* протокормов *Phalaenopsis*, охарактеризовать влияние брассинолида и кастастерона на рост и развитие протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в стерильной культуре.

Материалы и методы исследования

Объект исследования в настоящей работе – культура *in vitro* *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume. Для ее получения производился посев недозревших семян из цельных нераскрывшихся коробочек (рис. 1).

Данный метод является более предпочтительным в связи с простотой проведения. Семена не подвергаются прямому воздействию химикатов, что позволяет использовать более опасные стерилизующие вещества, которые дают больший процент стерильных жизнеспособных проростков [4]. В семенной кожуре недозревших семян еще не накопились вещества, которые отвечают за механизмы покоя семян, при данном условии значительно повышается процент их прорастания [4; 22].

Стерилизация коробочек *Phalaenopsis* осуществлялась посредством 3-кратной обработки 70 % этанолом с последующим обжигом в пламени спиртовки. После коробочки раскрывались стерильным

скальпелем, и уже стерильные семена засеивались на поверхность питательной среды. Для проращивания использовалась агаризованная среда Fast [23], дополненная 1,2 % сахарозы, 0,8 – фруктозы, 0,9 – агара, 0,2 – дрожжевого экстракта, 0,2 – пептона, 0,2 – активированного угля, 1 – мезоинозита, 1 % гумата калия (рН 5,5/КОН).

Семена культивировались в темноте при комнатной температуре до начала прорастания. Чашки с проросшими семенами переносились в условия, подобранные для роста протокормов согласно литературным данным [1–6; 24]: искусственное 16-часовое освещение при температуре (26 ± 2) °С и влажности 70–80 %. После формирования протокормов их переносили на среду Fast с добавлением брассинолида и кастастерона в концентрациях от 10^{-10} до 10^{-6} моль/л. Каждый вариант проводился в 3-кратной повторности с выборкой 16 растений. В качестве контроля использовалась безгормональная среда Fast. Световой и температурный режим для культивирования экспериментальных чашек не изменялся.

Рост стерильных протокормов микроклонов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume на средах, дополненных различными концентрациями БС, был проанализирован по длине и массе микрорастений, а также по длине их корней. Учет результатов производился на 100-е сутки после введения в среду гормонов.

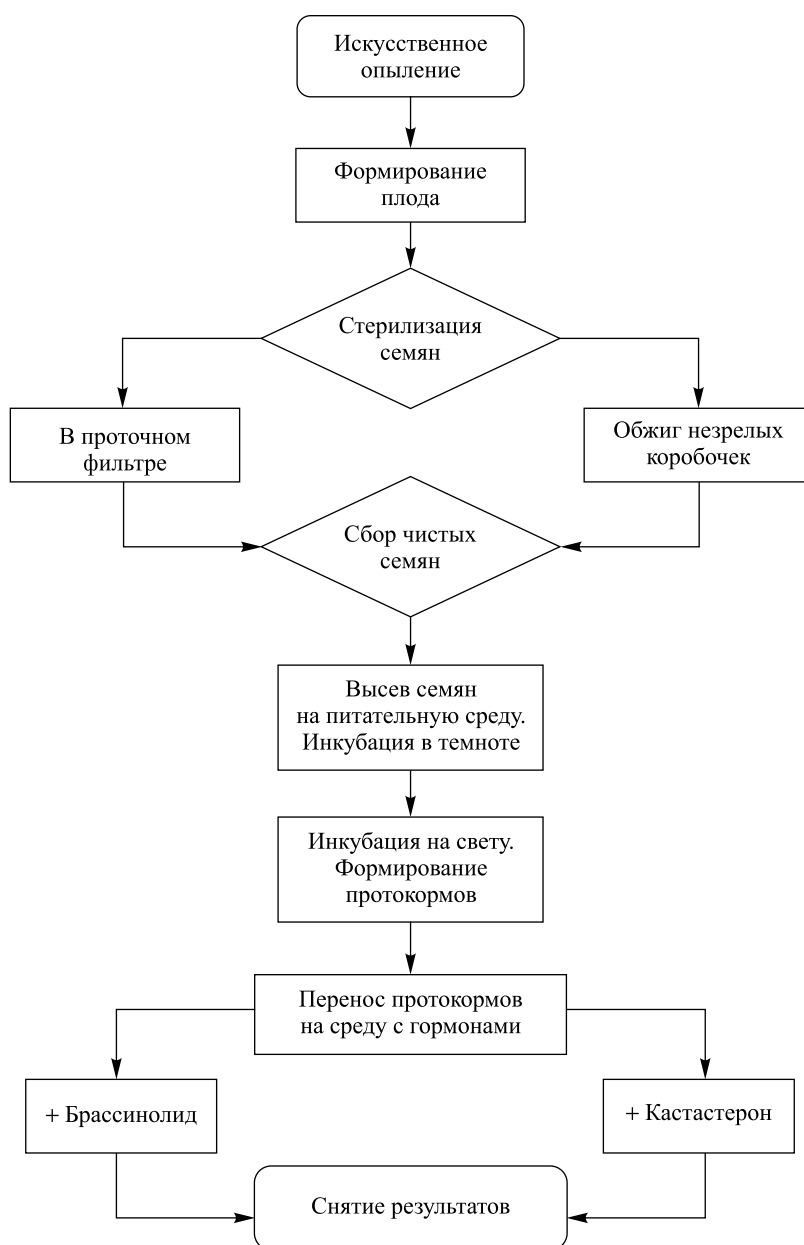


Рис. 1. Блок-схема методики проведения эксперимента
Fig. 1. Flowchart of experimental procedures

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программного пакета *GraphPad Prism* v. 7.0. Достоверность определялась с помощью *t*-критерия Стьюдента ($P \leq 0,01$). Данные представлены в виде $\bar{X} \pm Sx$, где $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение показателя; Sx – ошибка среднего арифметического.

Результаты и их обсуждение

Протестировано влияние двух основных БС: brassinотида и кастастерона – на рост протокоормов *Phalaenopsis* $\times$ *hybridum* Blume, полученных из семян, в условиях *in vitro* (рис. 2). Измерены длина и масса протокоормов на 100-е сутки выращивания при введении в агаризованную среду культивирования 10^{-10} – 10^{-6} моль/л brassинотида или кастастерона. В ходе проведенных экспериментов обнаружено, что добавление в среду БС во всем исследуемом спектре концентраций не вызывает изменений в морфологии микрорастений. Все сформировавшиеся микрорастения состояли из утолщенного стебля, 1–2 листьев характерной формы и 1 воздушного корня. Однако БС значительно интенсифицировали рост и развитие молодых растений, что проявлялось в увеличении длины протокоормов и приросте их биомассы (см. рис. 2).

Минимальная из протестированных концентраций brassинотида (10^{-10} моль/л) вызывала увеличение массы по сравнению с контролем на 30 % (табл. 1). Эффект постепенно усиливался с ростом тестируемой концентрации. Максимальный эффект достигался при 10^{-6} моль/л brassинотида, в этом случае наблюдалось 2,5-кратное увеличение массы растений по сравнению с контролем. Brassинотид также стимулирующе влиял на морфологические параметры растений, их размеры значительно возрастали. Уже в концентрации 10^{-10} моль/л наблюдалось достоверное увеличение длины протокоормов – на 28 % по сравнению с контролем (см. рис. 2, б, в). Добавление в среду brassинотида в концентрации 10^{-7} моль/л приводило к 2-кратному увеличению длины микрорастений *Phalaenopsis*. В концентрации 10^{-6} моль/л эффект выходил на насыщение.

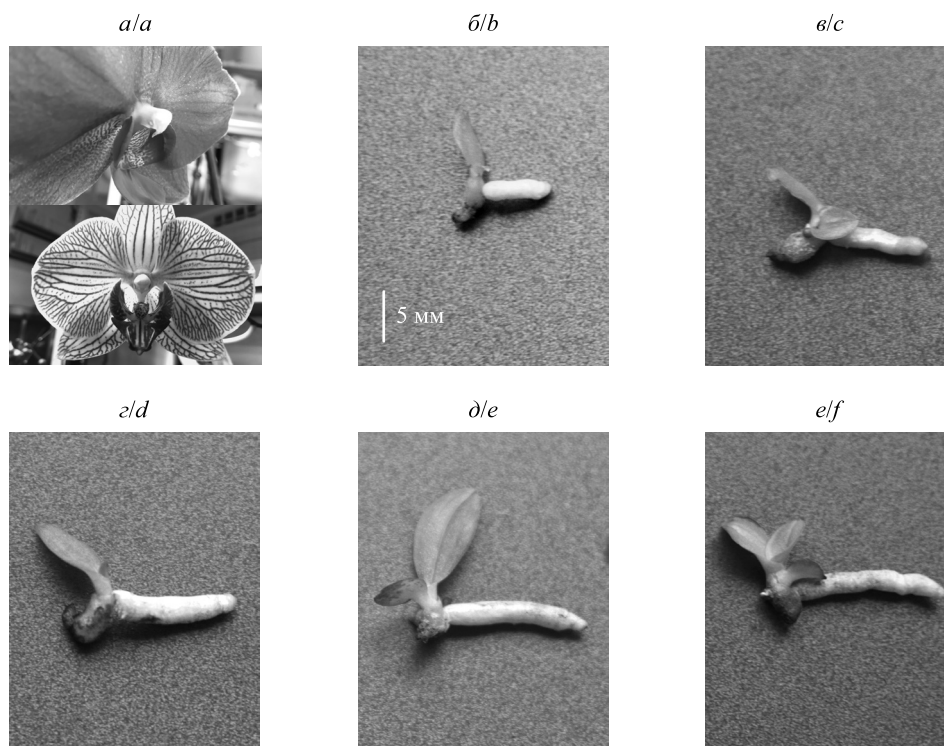


Рис. 2. Внешний вид микрорастений *Phalaenopsis* $\times$ *hybridum* Blume, сформировавшихся на 100-е сутки с момента обработки БС:
а – фенотип материнских линий; б – контроль; в – 10^{-10} моль/л brassинотида;
z – 10^{-10} моль/л кастастерона; d – 10^{-7} моль/л brassинотида; e – 10^{-7} моль/л кастастерона

Fig. 2. Phenotypes of *Phalaenopsis* $\times$ *hybridum* Blume seedlings after cultivation during 100 days in media containing brassinosteroids:
a – flowers of parental plants; b – control (brassinosteroid-free medium);
c – 10^{-10} mol $\cdot$ L $^{-1}$ brassinolide; d – 10^{-10} mol $\cdot$ L $^{-1}$ castasterone;
e – 10^{-7} mol $\cdot$ L $^{-1}$ brassinolide; f – 10^{-7} mol $\cdot$ L $^{-1}$ castasterone

Таблица 1

Воздействие брассинолида на рост микрорастений *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume, сформировавшихся из протокормов на 100-е сутки с момента обработки

Table 1

The effect of brassinolide on the growth of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume microplants after cultivation during 100 days

Концентрация брассинолида, моль/л	Масса растения, мг ($n = 16; \bar{X} \pm Sx$)	Длина растения, мм ($n = 16; \bar{X} \pm Sx$)
Нет (контроль)	46,3 ± 1,8	9,3 ± 0,3
10 ⁻¹⁰	60,1 ± 2,3	11,9 ± 0,6
10 ⁻⁹	70,5 ± 3,3	12,7 ± 0,5
10 ⁻⁸	79,8 ± 1,9	13,3 ± 0,6
10 ⁻⁷	105,1 ± 1,6	17,6 ± 0,7
10 ⁻⁶	112,6 ± 4,2	17,4 ± 0,4

Введение в среду кастастерона, так же как и брассинолида, стимулировало набор биомассы и усиление ростовых процессов микрорастений *Phalaenopsis* (табл. 2). Добавление 10⁻¹⁰ моль/л кастастерона вызывало прирост как массы, так и длины (приблизительно на 27 %; см. рис. 2, з). С повышением концентрации отмечалось усиление данного стимулирующего эффекта. Максимальное ростостимулирующее действие кастастерона достигалось при его концентрации 10⁻⁶ моль/л: регистрировались 2-кратный прирост биомассы растений и увеличение их длины по сравнению с контролем на 76 %. Следует отметить, что, несмотря на качественно схожие эффекты, брассинолид воздействовал на рост и набор биомассы сильнее.

Таблица 2

Воздействие кастастерона на рост микрорастений *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume, полученных из протокормов (100 сут)

Table 2

The action of castasterone on the growth parameters of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume cultivated from seeds during 100 days

Концентрация кастастерона, моль/л	Масса растения, мг ($n = 16; \bar{X} \pm Sx$)	Длина растения, мм ($n = 16; \bar{X} \pm Sx$)
Нет (контроль)	46,3 ± 1,8	9,3 ± 0,3
10 ⁻¹⁰	58,9 ± 2,4	11,8 ± 0,2
10 ⁻⁹	65,3 ± 3,6	12,6 ± 0,3
10 ⁻⁸	68,1 ± 2,9	13,3 ± 0,3
10 ⁻⁷	87,2 ± 2,3	15,2 ± 0,3
10 ⁻⁶	97,2 ± 2,7	16,4 ± 0,2

В настоящей работе также был проведен анализ морфологических характеристик корневой системы микрорастений, выращенных на среде с БС. Наблюдалось достоверное увеличение длины корней по сравнению с контрольными растениями во всем диапазоне протестированных концентраций БС (табл. 3). На среде с 10⁻¹⁰ моль/л брассинолида отмечалось ускорение удлинения корня на 44 % ($P = 0,0018$). Для кастастерона данное ускорение составило 64 % ($P < 0,0001$). Прослеживалось усиление эффекта с ростом действующих концентраций БС. Максимальный стимулирующий эффект на удлинение корня был выявлен на средах с 10⁻⁷ моль/л брассинолида и кастастерона, он проявлялся в 3-кратном ускорении процесса роста.

В представленной работе выполнено первое для орхидных тестирование влияния БС на рост протокормов в культуре *in vitro*. Для важнейшей модели *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume результаты тестирования ростостимулирующей активности БС также приводятся впервые. Литературные данные указывают на то, что БС способны модифицировать рост некоторых других видов орхидных [25–27]. Например, микромолярные уровни 28-гомобрассинолида показали эффективность в качестве стимуляторов регенерации побегов трех сортов *Dendrobium* [25]. Это согласуется с данными о стимулирующем влиянии микромолярных концентраций БС на рост *Phalaenopsis*, полученными в настоящей работе.

Таблица 3

Длина корней микрорастений *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume
на 100-е сутки с момента обработки БС

Table 3

Mean root length of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume microplants
after cultivation during 100 days in media containing brassinosteroids

Концентрация БС, моль/л	Длина корня, мм ($n = 16$; $\bar{X} \pm Sx$), при обработке	
	брасинолидом	кастастероном
10^{-10}	$5,9 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,4$
10^{-9}	$7,4 \pm 0,5$	$10,3 \pm 0,5$
10^{-8}	$11,7 \pm 0,6$	$11,4 \pm 0,4$
10^{-7}	$11,9 \pm 0,5$	$12,4 \pm 0,4$
10^{-6}	$9,8 \pm 0,6$	$12,3 \pm 0,4$

Примечание. Длина корня в безгормональной среде (контроль) составила ($4,1 \pm 0,4$) мм.

Как регулятор роста при размножении орхидей *in vitro* 24-эпибрасинолид (ЭБ) был применен для инициации образования протокормоподобных тел (ППТ) *Cymbidium elegans* из верхушек побегов [26]. Наибольшая доля эксплантов (91 %), формирующих ППТ, была зарегистрирована на среде Митра с добавлением 4 мкмоль/л ЭБ. Добавление в среду Митра ЭБ также привело к индукции ППТ у растений *Cymbidium bicolor* [27]. Максимальный эффект на образование ППТ (стимуляция на 86 %) был обнаружен при культивировании поперечных тонкоклеточных слоев верхушек побегов на среде с добавлением ЭБ в концентрации 3 мкмоль/л.

Таким образом, проведенные исследования выявили высокую ростостимулирующую активность стероидных фитогормонов, в частности брасинолида и кастастерона, у представителей орхидных. Впервые показана стимуляция роста протокормов в культуре *in vitro* под действием БС, что может быть полезно при создании систем ускоренного размножения орхидей в искусственных условиях. Важно отметить, что БС не изменяли качественных показателей развития орхидей, т. е. влияли главным образом на скорость ростовых процессов. Полученные результаты могут найти прямое применение как в физиологии, так и в биотехнологии растений.

Библиографические ссылки

1. Lopez RG, Runkle ES. Environmental physiology of growth and flowering of orchids. *HortScience*. 2005;40(7):1969–1973.
2. Jones D, Tisserat B. Clonal propagation of orchids. *Methods in Molecular Biology*. 1990;6:181–191. DOI: 10.1385/0-89603-161-6:181.
3. Baker A, Negahdar N, Kaviani B. Micropropagation of *Orchis catasetum* – a rare and endangered orchid. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*. 2014;13(2):197–205.
4. Paek KY, Hahn EJ, Park SY. Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. *Methods in Molecular Biology*. 2011;710:293–306. DOI: 10.1007/978-1-61737-988-8_20.
5. Saad AIM, Elshahed AM. Plant tissue culture media. In: Rinaldi L (ed.) *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. 2012;2:29–40. DOI: 10.5772/50569.
6. Villa F, Pasqual M, Silva EF. Micropropagation of orchid hybrids in Knudson culture medium with addition of vitamins of MS culture medium, benzilaminopurine and activated charcoal. *Semina: Ciências Agrárias*. 2014;35(2):683–693. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p683.
7. Liu J, Gao H, Wang X. Effects of 24-epibrassinolide on plant growth, osmotic regulation and ion homeostasis of salt-stressed canola. *Plant Biology*. 2014;16(2):440–450. DOI: 10.1111/plb.12052.
8. Wu X. Effects of brassinolide on the antioxidant system and photosynthesis of cucumber seedlings under suboptimal temperature, light and salt environment. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 2015;26(9):2751–2757.
9. Clouse SD, Sasse JM. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998;49:427–451. DOI: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427.
10. Khripach V, Zhabinskii V, de Groot A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of Botany*. 2000;86(3):441–447. DOI: 10.1006/anbo.2000.1227.
11. Ahammed GJ, Xia XJ, Li X, Shi K, Yu JQ, Zhou YH. Role of brassinosteroid in plant adaptation to abiotic stresses and its interplay with other hormones. *Current Protein and Peptide Science*. 2015;16(5):462–473. DOI: 10.2174/1389203716666150330141427.
12. Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009;47(1):1–8. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002.
13. Kutschera U, Wang Z-Y. Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(10):3511–3522. DOI: 10.1093/jxb/ers065.

14. Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, Tao Y, Mao WH, Shi K, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology*. 2009;150(2):801–814. DOI: 10.1104/pp.109.138230.
15. Hartwig T, Chuck GS, Fujioka S, Klempien A, Weizbauer R, Potluri DPV, et al. Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(49):19814–19819. DOI: 10.1073/pnas.1108359108.
16. Wu CY, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok SF, Harris S, Zhang K, et al. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *The Plant Cell*. 2008;20(8):2130–2145. DOI: 10.1105/tpc.107.055087.
17. Kaur N, Kirat K, Saini S, Sharma I, Gantet P, Pati PK. Reactive oxygen species generating system and brassinosteroids are linked to salt stress adaptation mechanisms in rice. *Plant Signaling and Behavior*. 2016;11(12). DOI: 10.1080/15592324.2016.1247136.
18. Wang F, Bai MY, Deng Z, Osés-Prieto JA, Burlingame AL, Lu T, et al. Proteomic study identifies proteins involved in brassinosteroid regulation of rice growth. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010;52(12):1075–1085. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00992.x.
19. Козлова ОН, Бурчик НА. *In vitro* коллекция орхидных в ЦБС НАН Беларуси. *Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: сборник докладов II Всероссийской научно-практической конференции, 19–21 августа 2008, Волгоград, Россия*. Белгород: БелГУ; 2008. с.109–112.
20. Mukerji KG, Chamola BP, Sharma AK. *Glimpses in botany*. The orchid protocorm: on opinion. New Delhi: APH Publishing Corporation; 1996.
21. Черевченко ТМ, Лаврентьева АН, Иванников РВ. *Биотехнология тропических и субтропических растений in vitro*. Киев: Наукова Думка; 2008.
22. Balilashaki K, Gantait S, Naderi R, Vahedi M. Capsule formation and asymbiotic seed germination in some hybrids of *Phalaenopsis*, influenced by pollination season and capsule maturity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015;21(3):341–347. DOI: 10.1007/s12298-015-0309-z.
23. Fast G. *Orcideen kultur*. Stuttgart: Ulmer, 1980.
24. Zeng SJ, Huang W, Wu K. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(3):521–534. DOI: 10.3109/07388551.2014.993585.
25. Kumari IP, George TS. A study on *in vitro* shoot morphogenesis in *Dendrobium* cultivars induced by steroid plant growth regulator 28-homobrassinolide (28-hBL). *Acta Horticulturae*. 2017;1165:73–78. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1165.10.
26. Malabadi RB, Nataraja K. Brassinosteroids influences *in vitro* regeneration using shoot tip sections of *Cymbidium elegans* Lindl. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2007;6(2):308–313. DOI: 10.3923/ajps.2007.308.313.
27. Malabadi RB, Teixeira JA, Nataraja K. Shoot tip transverse thin cell layers and 24-epibrassinolide in the micropropagation of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 2015;2(2):44–48.

References

1. Lopez RG, Runkle ES. Environmental physiology of growth and flowering of orchids. *HortScience*. 2005;40(7):1969–1973.
2. Jones D, Tisserat B. Clonal propagation of orchids. *Methods in Molecular Biology*. 1990;6:181–191. DOI: 10.1385/0-89603-161-6:181.
3. Baker A, Negahdar N, Kaviani B. Micropropagation of *Orchis catasetum* – a rare and endangered orchid. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*. 2014;13(2):197–205.
4. Paek KY, Hahn EJ, Park SY. Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. *Methods in Molecular Biology*. 2011;710:293–306. DOI: 10.1007/978-1-61737-988-8_20.
5. Saad AIM, Elshahed AM. Plant tissue culture media. In: Rinaldi L (ed.) *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. 2012;2:29–40. DOI: 10.5772/50569.
6. Villa F, Pasqual M, Silva EF. Micropropagation of orchid hybrids in Knudson culture medium with addition of vitamins of MS culture medium, benzilaminopurine and activated charcoal. *Semina: Ciências Agrárias*. 2014;35(2):683–693. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p683.
7. Liu J, Gao H, Wang X. Effects of 24-epibrassinolide on plant growth, osmotic regulation and ion homeostasis of salt-stressed canola. *Plant Biology*. 2014;16(2):440–450. DOI: 10.1111/plb.12052.
8. Wu X. Effects of brassinolide on the antioxidant system and photosynthesis of cucumber seedlings under suboptimal temperature, light and salt environment. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 2015;26(9):2751–2757.
9. Clouse SD, Sasse JM. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998;49:427–451. DOI: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427.
10. Khripach V, Zhabinskii V, de Groot A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of Botany*. 2000;86(3):441–447. DOI: 10.1006/anbo.2000.1227.
11. Ahammed GJ, Xia XJ, Li X, Shi K, Yu JQ, Zhou YH. Role of brassinosteroid in plant adaptation to abiotic stresses and its interplay with other hormones. *Current Protein and Peptide Science*. 2015;16(5):462–473. DOI: 10.2174/1389203716666150330141427.
12. Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009;47(1):1–8. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002.
13. Kutschera U, Wang Z-Y. Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(10):3511–3522. DOI: 10.1093/jxb/ers065.
14. Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, Tao Y, Mao WH, Shi K, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology*. 2009;150(2):801–814. DOI: 10.1104/pp.109.138230.
15. Hartwig T, Chuck GS, Fujioka S, Klempien A, Weizbauer R, Potluri DPV, et al. Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(49):19814–19819. DOI: 10.1073/pnas.1108359108.
16. Wu CY, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok SF, Harris S, Zhang K, et al. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *The Plant Cell*. 2008;20(8):2130–2145. DOI: 10.1105/tpc.107.055087.

17. Kaur N, Kirat K, Saini S, Sharma I, Gantet P, Pati PK. Reactive oxygen species generating system and brassinosteroids are linked to salt stress adaptation mechanisms in rice. *Plant Signaling and Behavior*. 2016;11(12). DOI: 10.1080/15592324.2016.1247136.
18. Wang F, Bai MY, Deng Z, Osés-Prieto JA, Burlingame AL, Lu T, et al. Proteomic study identifies proteins involved in brassinosteroid regulation of rice growth. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010;52(12):1075–1085. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00992.x.
19. Kozlova ON, Burchik NA. *In vitro* kollektsiya orkhidnykh v Tsentral'nom botanicheskom sadu Natsional'noi Akademii nauk Belarusi. *Biotehnologiya kak instrument sokhraneniya bioraznoobraziya rastitel'nogo mira: sbornik dokladov II Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, 19–21 August 2008, Volgograd, Russia*. Belgorod: BelGU; 2008. p.109–112 (in Russ.).
20. Mukerji KG, Chamola BP, Sharma AK. Glimpses in botany. The orchid protocorm: on opinion. New Delhi: APH Publishing Corporation; 1996.
21. Cherevchenko TM, Lavrentyeva AN, Ivannikov RV. Biotechnology of tropical and subtropical plants *in vitro*. Kyiv: Naukova dumka; 2008 (in Russ.).
22. Balilashaki K, Gantait S, Naderi R, Vahedi M. Capsule formation and asymbiotic seed germination in some hybrids of *Phalaenopsis*, influenced by pollination season and capsule maturity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015;21(3):341–347. DOI: 10.1007/s12298-015-0309-z.
23. Fast G. *Orcideen kultur*. Stuttgart: Ulmer, 1980.
24. Zeng SJ, Huang W, Wu K. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(3): 521–534. DOI: 10.3109/07388551.2014.993585.
25. Kumari IP, George TS. A study on *in vitro* shoot morphogenesis in *Dendrobium* cultivars induced by steroid plant growth regulator 28-homobrassinolide (28-hBL). *Acta Horticulturae*. 2017;1165:73–78. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1165.10.
26. Malabadi RB, Nataraja K. Brassinosteroids influences *in vitro* regeneration using shoot tip sections of *Cymbidium elegans* Lindl. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2007;6(2):308–313. DOI: 10.3923/ajps.2007.308.313.
27. Malabadi RB, Teixeira JA, Nataraja K. Shoot tip transverse thin cell layers and 24-epibrassinolide in the micropropagation of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 2015;2(2):44–48.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Филипцова Г. Г., Юрин В. М., Соколик А. И., Демидчик В. В. К 90-летию кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета БГУ.....	3
Мацкевич В. С., Самохина В. В., Гриусевич П. В., Войтехович М. А., Соколик А. И., Демидчик В. В. Са ²⁺ -проницаемые катионные каналы плазматической мембраны клеток высших растений.....	11
Войтехович М. А., Кучинская В. А., Новосельский И. Ю., Гриусевич П. В., Самохина В. В., Мацкевич В. С., Соколик А. И., Демидчик В. В. L-Аскорбиновая кислота как антиоксидант и сигнально-регуляторный агент в клетках высших растений...	27
Звонарёв С. Н., Демидчик В. В. <i>Physcomitrella patens</i> как модельный организм в экспериментальной биологии растений.....	39
Молчан О. В., Юрин В. М. Влияние LED-освещения различного спектрального состава на рост и биосинтез алкалоидов в каллусных культурах <i>Vinca minor</i>	48
Дитченко Т. И., Юрин В. М. Регуляция продукции вторичных метаболитов фенольной природы каллусной культурой <i>Echinacea purpurea</i> L. Moench корневого происхождения	57
Смольская О. С., Жукова А. А., Люля А. С. Пигментные и физико-химические характеристики донных отложений озера Нарочь и Мястро	65
Можаровская Л. В. Функциональная аннотация генов <i>Pinus sylvestris</i> , ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микромицетам	78
Капитанская О. С., Пряжкина Г. А., Стасик О. О. Влияние обработки растений карбоксилатами микроэлементов на фотосинтетические пигменты в листьях озимой пшеницы	85
Красинская Т. А., Змушко А. А. Морфогенез растений-регенерантов сортов винограда в культуре <i>in vitro</i> при использовании биологически активных веществ синтетического происхождения.....	95
Черныш М. А., Пржевальская Д. А., Горский И. А., Колбанов Д. В., Жабинский В. Н., Хрипач В. А., Демидчик В. В. Модификация процессов роста и набора биомассы протокормов <i>Phalaenopsis</i> × <i>hybridum</i> Blume в культуре <i>in vitro</i> под действием брассинолида и кастастерона.....	105

CONTENTS

PLANT CELL BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

<i>Filipstsova H. G., Yurin V. M., Sokolik A. I., Demidchik V. V.</i> To the 90 th anniversary of the department of plant cell biology and bioengineering of the Belarusian State University.....	3
<i>Mackievic V. S., Samokhina V. V., Hryvusevich P. V., Vaitsiakhovich M. A., Sokolik A. I., Demidchik V. V.</i> Ca ²⁺ -permeable cation channels of the plasma membrane of higher plant cells.....	11
<i>Vaitsiakhovich M. A., Kuchinskaya V. A., Navaselsky I. Yu., Hryvusevich P. V., Samokhina V. V., Mackievic V. S., Sokolik A. I., Demidchik V. V.</i> L-Ascorbic acid as an important antioxidant and signal-regulatory agent in the cells of higher plants.....	27
<i>Zvanarou S. N., Demidchik V. V.</i> <i>Physcomitrella patens</i> as a model organism in experimental plant biology	39
<i>Molchan O. V., Yurin V. M.</i> Effect of LED-lighting with various spectral composition on the growth and alkaloids biosynthesis in <i>Vinca minor</i> callus cultures	48
<i>Ditchenko T. I., Yurin V. M.</i> Regulation of phenolic secondary metabolites production by <i>Echinacea purpurea</i> L. Moench callus culture of root origin	57
<i>Smolskaya O. S., Zhukava H. A., Lyulya A. S.</i> Analysis of pigment, physical and chemical characteristics of bottom sediments in lakes Narochny and Myastro	65
<i>Mozharovskaya L. V.</i> Functional annotation of genes of <i>Pinus sylvestris</i> associated with resistance to phytopathogenic micromycetes	78
<i>Kapitanska O. S., Priadkina G. A., Stasik O. O.</i> The effect of foliar application of microelements carboxylate on photosynthetic pigments in winter wheat leaves	85
<i>Krasinskaya T. A., Zmushko A. A.</i> Morphogenesis of grape microplants in <i>in vitro</i> culture using biologically active substances of synthetic origin.....	95
<i>Charnysh M. A., Przhivalskaya D. A., Horski I. A., Kolbanov D. V., Zhabinskii V. N., Khripach V. A., Demidchik V. V.</i> Brassinolide- and castasterone-induced modifications of growth processes and biomass accumulation in <i>in vitro</i> culture of <i>Phalaenopsis</i> × hybridum Blume protocorms	105

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

**Журнал Белорусского
государственного университета. Биология.
№ 2. 2018**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.
Почтовый адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.
Тел. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.
E-mail: jbiol@bsu.by

«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология» издается с января 1969 г.
До 2017 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»
(ISSN 2308-9164).

Редактор *Т. Р. Джум*
Технический редактор *В. В. Кильдишева*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 29.06.2018.
Тираж 100 экз. Заказ 220.

Республиканское унитарное предприятие
«Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».
ЛП № 02330/89 от 03.03.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

© БГУ, 2018

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 2. 2018**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.
Correspondence address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.
Tel. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.
E-mail: jbiol@bsu.by

«Journal of the Belarusian State University. Biology»
published since January, 1969.
Until 2017 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»
(ISSN 2308-9164).

Editor *T. R. Jum*
Technical editor *V. V. Kil'disheva*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 29.06.2018.
Edition 100 copies. Order number 220.

Republican Unitary Enterprise
«Informatsionno-vychislitel'nyi tsentr
Ministerstva finansov Respubliki Belarus'».
License for publishing No. 02330/89, 3 March, 2014.
17 Kal'varyjskaja Str., Minsk 220004.

© BSU, 2018