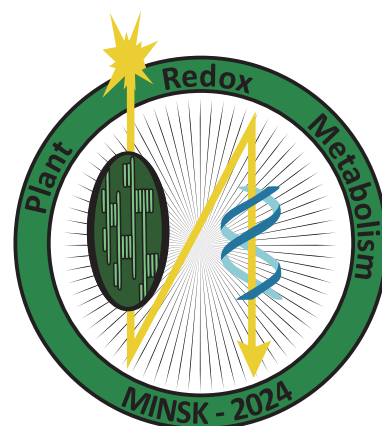




МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ

**Тезисы докладов
IV Международного симпозиума
и школы молодых ученых
«Роль активных форм кислорода
и азота в жизни растений»**

**Республика Беларусь
Минск, 25–28 августа 2024 г.**



БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА «КАЗАНСКИЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»



БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ



КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ
И БИОФИЗИКИ ФИЦ КазНЦ РАН

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ

**Тезисы докладов
IV Международного симпозиума
и школы молодых ученых
«Роль активных форм кислорода и азота
в жизни растений»**

**Республика Беларусь
Минск, 25–28 августа 2024 г.**

Минск
БГУ
2024

УДК 581.1(06)
ББК 28.57я431
М75

Редакционная коллегия:

кандидат биологических наук, доцент *Н. Л. Пшибытко* (гл. ред.);
кандидат биологических наук *О. Г. Яковец*;
В. С. Мацкевич, П. О. Прохорчик, Т. О. Коциц

Рецензенты:

доктор биологических наук *Ф. В. Минибаева*;
доктор биологических наук, профессор *С. С. Медведев*

Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений : тез.
М75 докл. IV Междунар. симп. и школы молодых ученых «Роль активных форм кислорода в жизни растений», Респ. Беларусь, Минск, 25–28 авг. 2024 г. / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: Н. Л. Пшибытко (гл. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2024. – 339 с.
ISBN 978-985-881-662-9.

Представлены исследования ученых из Беларуси, России, Южной Африки, посвященные роли активных форм кислорода и азота, а также свободных радикалов, окислителей и антиоксидантов в жизни растений. Описаны механизмы генерации редокс-активных соединений, их значение в фотосинтезе, дыхании, первичном и вторичном метаболизме, клеточной сигнализации, росте, развитии и ответе растения на стресс. Рассмотрены вопросы редокс-зависимой модификации биомолекул, изменения протеомов, транскриптомов и метаболомов растений, а также механизмы повреждения и репарации растительных систем при окислительном стрессе.

УДК 581.1(06)
ББК 28.57я431

ISBN 978-985-881-662-9

© БГУ, 2024

ПРЕДИСЛОВИЕ

Одним из парадоксов жизни на нашей планете является то, что кислород – молекула, поддерживающая аэробную жизнь и служащая основой для энергетического метаболизма, вовлечена во многие дегенеративные процессы и болезни. Высокая окислительная способность кислорода, необходимая для его функционирования в дыхательной системе, фотосинтезе, способствует образованию токсичных кислородных радикалов, или активных форм кислорода (АФК). Вместе с тем, АФК являются ключевыми сигнальными молекулами, вовлеченными в регуляцию метаболических процессов и защитных реакций живых клеток. Знание о молекулярных механизмах и физиологических последствиях окислительно-восстановительных превращений высокомолекулярных соединений растительной клетки является фундаментальной основой для направленного изменения процессов роста и устойчивости растений. В настоящем сборнике представлены материалы IV Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Школы молодых учёных «Роль активных форм кислорода в жизни растений», проходящих 25–28 августа 2024 в Белорусском государственном университете, Минск, Беларусь. В симпозиуме приняли участие более 90 ученых из 25 научных учреждений. Сборник будет интересен специалистам-биологам, химикам, биотехнологам, студентам вузов биологических, химических, сельскохозяйственных направлений.

От имени Организационного комитета

Сопредседатели симпозиума

В. В. Демидчик, член-корреспондент НАН Беларуси,
доктор биологических наук, профессор

Ф. В. Минибаева, доктор биологических наук, профессор

INTRODUCTION

One of the paradoxes of life on our planet is that oxygen, a molecule that supports aerobic life and serves as the basis for energy metabolism, is involved in many degenerative processes and diseases. The high oxidizing ability of oxygen, necessary for its functioning in the respiratory system, photosynthesis, contributes to the formation of toxic oxygen radicals, or reactive oxygen species (ROS). At the same time, ROS are key signaling molecules involved in the regulation of metabolic processes and protective reactions of living cells. Knowledge of the molecular mechanisms and physiological consequences of redox transformations of high-molecular compounds of a plant cell is a fundamental basis for the directed change of plant growth and resistance processes. This collection presents the materials of the IV International Symposium "Molecular Aspects of Plant Redox Metabolism" and the School of Young Scientists "The Role of reactive Oxygen Species in plant Life", held on August 25-28, 2024 at the Belarusian State University, Minsk, Belarus. More than 90 scientists from 25 scientific institutions took part in the symposium. The collection will be of interest to specialists-biologists, chemists, biotechnologists, university students of biological, chemical, and agricultural fields.

On behalf of the Organizing Committee

Symposium Co-Chairs

V.V. Demidchik, Corresponding member of NAS of Belarus, Prof

F. V. Minibayeva, Prof

Avoidance of ROS formation during fluctuating light stress in the photobionts of lichenized ascomycetes

Beckett R. P.^{A*}, Minibayeva F. V.^B

^A *University of Kwa-Zulu Natal, School of Life Sciences, PBag X01, Scottsville 3209, South Africa. *E-mail: rpbeckett@gmail.com*

^B *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center of RAS”, P.O. Box 261, 420111 Kazan, Russia*

When lichens absorb more light energy than they can use to fix carbon, this excess energy can activate ground state oxygen. The resulting reactive oxygen species (ROS) can react with many cellular constituents, causing photoinhibition and a reduction in growth. Many shade lichens grow in microhabitats in which their light environment is not stable, but rather fluctuates dramatically on a scale from seconds to minutes. The brief increases in solar irradiance that occur in the understories of forests are termed sunflecks, and such increases are likely to cause light stress. Photosynthetic organisms use a wide range of defences against light stress. These include repair, ROS scavenging and a variety of mechanisms to avoid ROS formation. While in theory, any mechanism that defends against high light will also protect against fluctuating light, some mechanisms are likely to be more effective than others. Here we present data suggesting that the possession of high, rapidly inducing and relaxing non-photochemical quenching (NPQ) is likely to protect photosystem two (PSII) in lichens. Photosystem one (PSI) is likely to be protected by cyclic and flavodiiron-mediated pseudocyclic electron flow. It is now increasingly recognised that as a consequence of canopy architecture, the lower leaves of many higher plants are subjected to rapid fluctuations in light, and studies on shade lichens may inform attempts to improve photosynthesis in crop species.

Analysis of the primary metabolome in the study of redox processes in plants

**Frolova N.^{A*}, Tarakhovskaya E.^B, Vereshchagin M.^A, Orlova A.^A,
Silinskaya S.^A, Basnet A.^C, Pashkovskij P.^A, Bilova T.^{A,B}, Frolov A.^{A,C}**

^A *Laboratory of Biotechnology and Bioanalytical Chemistry, Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^B *Department of Plant Physiology and Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia,*

^C *Leibniz institute of Plant Biochemistry, Halle (Saale), Germany*

**E-mail: frolovanadja@yandex.ru*

Metabolomics is a broad-scale and sensitive approach that provides information on the composition and dynamics of the plant metabolome. This information has increasing applications not only for plant phenotyping and chemotyping, but also for understanding the mechanisms underlying plant responses to various environmental stresses. In the adaptation of plants to negative factors, an important role also belongs to the functioning of efficient antioxidant systems capable of providing protection against reactive oxygen species accumulated under stress related to various environmental and biotic factors. Exposure to these factors triggers induction of antioxidant system. Due to this, plants acquire resistance to the stressor. Dynamics of low molecular weight compounds (ascorbic acid, hydrogen peroxide, carotenoids, glutathione, tocopherol, flavonoids), enzymes (peroxidase, catalase, superoxide dismutase, etc.), and photosynthetic pigments might be considered as reliable indicators of the physiological state of plants. These markers represent the “household molecules”, i.e. constituents of primary metabolome, which are directly related to adaptive metabolic rearrangements, and dynamics of their contents is highly informative in the context of stress biochemistry. Under stress conditions, compensatory metabolic pathways of plant adaptation involve reorganisation of respiratory metabolism, glycolysis, oxidative pentose phosphate pathway, supplying ATP, intermediates for biosynthesis and biological reducing agents. A complex approach to characterize the dynamics of the plant primary metabolome under stress conditions is established in the Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology at the K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences. Our analytical strategy assumes analysis of primary thermostable and thermolabile metabolites by gas chromatography coupled on-line to the electron ionisation quadrupole mass spectrometry (GC-EI-Q-MS) and ion-pair reversed phase high-performance liquid chromatography, coupled online to tandem mass spectrometry accomplished with a triple-quadrupole mass analyser (RP-IP-HPLC-QqQ-MS/MS). Identification of the primary thermally stable metabolites relies on the spectral similarity search with consideration of the characteristic retention times

(t_{RS}), and retention indices (RIs) of analytes in experimental samples and standard substances of known mass spectrometric libraries of NIST (National Institute of Standards and Technology), GMD (Golm Metabolome Database) and in-house library based on defined mixtures of authentic standards. Analysis of the primary thermally labile metabolites relies on multiple reaction monitoring (MRM) experiments and representative panel of relevant authentic standards using MultiQuant™ 3.0.3 software. The resulting metabolite matrices are processed with the online tool MetaboAnalyst 6.0. Thus, analyses of the dynamics of the primary metabolome (including detailed deciphering of the influence of individual metabolic reactions) can provide access to key regulatory pathways and possible mechanisms of redox processes accompanying plant development, senescence, and stress responses, and the involvement of genomics, proteomics, and physiology data can make a significant contribution to understanding the plasticity of the plant metabolome. The research was supported by RSF (project no.23-14-00266).

Why proteomics is not a silver bullet in glycation research: peptide-based glycation models as a tool to address the mechanisms behind glycation in plants

**Frolova N.^{A*}, Herfurth U. M.^B, Duc N. V.^C, Soboleva A.^{A,C},
Birkemeyer C.^D, Bilova T.^{C,E}, Frolov A.^{A,C}**

^A *Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology, Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Science, Botanicheskaya Street 35, Moscow, Russia.*

**E-mail: frolovanadja@yandex.ru*

^B *Department Food Safety, Federal Institute for Risk Assessment (BfR);*

^C *Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry;*

^D *Faculty of Chemistry and Mineralogy, Universität Leipzig;*

^E *Department of Plant Physiology and Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg State University, Universitetskaya Emb.7-9, St. Petersburg, Russia;*

Keywords: Advanced glycation end products (AGEs), bottom-up proteomics, GC-MS, LC-MS, model synthetic peptides, protein glycation, peptide-based glycation models.

Protein glycation (often also referred as Maillard reaction of proteins) is usually referred to as an arrow of post-translational modifications targeting side chains of lysine, arginine and, to less extent, cysteine residues in proteins. Carbonyl compounds – sugars, their derivatives and α -dicarbonyls, act as potent glycation agents, yielding broad patterns of early and advanced glycation end products (AGEs). To date, the Maillard reaction of proteins is comprehensively described in the food chemistry and clinical aspects. In this context, resulting

advanced glycation end products (AGEs) were repeatedly reported as important modulators of human metabolism and pathology markers. Later on, it was shown that the phenomenon of glycation is universal for all living organisms and is characteristic not only for animals and humans, but also microorganisms and plants. However, in comparison to humans, the patterns of plant protein glycation are characterized with much higher diversity, complexity, dynamics and strong predominance of AGE formation over early glycation (i.e. formation of Amadori and Heyns products). This high complexity of glycation patterns might be attributed to tremendous diversity of plant carbonyl compounds. The accumulated so far data indicate prospective signaling and/or regulatory role of these glycative modifications. Therefore, understanding the complexity of the pathways and mechanisms of plant glycation might give access to prospective glycation-related mechanisms.

To access the complex patterns of plant glycation, the whole network of the Maillard reaction, which relays on multiple glycation agents, might be dissected in individual reactions. To date the main two approaches to address the Maillard chemistry of proteins are (i) amino acid-based glycation models and (ii) bottom up proteomics. Unfortunately, both these techniques have serious limitations. Indeed, while the amino acid models appear too simple for *in planta* processes, bottom up proteomics is not able to deliver the complete pattern of modifications at the specific site. The reason for this is the probability-based statistical approach for sequence identification and protein annotation. Moreover, untargeted proteomics assumes identification of only fragmented species that is not always the case with low-abundant AGE-related signals.

Therefore, to fill this gaps, we employ *in vitro* peptide-based glycation model, which relies on reaction of partly protected decapeptides with lysine or arginine residues in mid position with individual sugars and their derivatives. Employment of the combined chromatography-mass spectrometry-based peptidomics and metabolomics platforms allowed parallel identification of peptide-based glycation products and dynamics of related metabolites. With this approach, we addressed a broad selection of plant sugars and their derivatives which demonstrated essential variations in reactivity. Besides this, we found that the patterns of glycation products were strongly specific for particular glycation agents. Consideration of these results in the context of stress-related dynamics of plant metabolome allowed annotation of specific stress induced plant metabolites as case-specific glycation agents. This result delivers a new confirmation for the prospective signaling and regulatory role of protein glycation in plants. Thereby, amide AGEs appeared to be the most promising candidates for the new glycation-related plant signaling molecules.

Протекторные эффекты салицилата натрия при адаптации растений пшеницы к действию кадмия

Абилова Г. А.^{А*}

^А Дагестанский государственный университет, кафедра физиологии растений и биотехнологии, Махачкала, Россия. *E-mail: gulyaraabilova@mail.ru

Вследствие индустриализации и урбанизации в последние десятилетия содержание тяжелых металлов (ТМ) в окружающей среде резко возрастает. Одним из самых опасных среди них является кадмий, так как наносит вред живому организму не только вследствие высокой токсичности, но и из-за его способности накапливаться в больших количествах в живом организме, не теряя свои отрицательные свойства [Титов и др., 2014]. У растений соединения кадмия ингибируют рост, снижают биомассу, отрицательно влияют на такие процессы, как фотосинтез, клеточное дыхание, минеральный обмен.

В настоящее время одной из задач фитофизиологии является создание препаратов, состоящих из физиологически активных веществ, обладающих антистрессовым эффектом. В качестве одного из таких соединений предлагается использовать салициловую кислоту (СК). Появляется все больше фактов, свидетельствующих о том, что СК реализует свой эффект через воздействие на окислительно-восстановительный статус растительной клетки, изменяя метаболические пути, ответственные за адаптацию растений к стрессу [Колупаев и др., 2021]. В связи с этим представляет интерес изучение влияния СК в разных концентрациях на параметры роста и уровень окислительного стресса при действии соли кадмия – CdSO_4 на растения.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния салицилата натрия (CNa) – растворимой в воде формы СК – на перекисный гомеостаз растений пшеницы сорта «Асеф» при последующем воздействии на них соли ТМ – CdSO_4 .

Объектом исследования были проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Асеф». Семена растений, предварительно обработанные в течение 20 мин 1% раствором KMnO_4 , подвергали предпосевной обработке растворами CNa с концентрациями 0,1мМ, 0,5 мМ, 1,0 мМ и 5,0 мМ в течение двух дней, далее проростки пересаживали по 30 штук в пластиковые контейнеры на фильтровальную бумагу и выращивали при поливе раствором CdSO_4 с концентрацией 10^{-3}М . Контролем служили семена, проращиваемые при поливе дистиллированной водой. Проростки росли в климатической камере при 12-часовом фотопериоде, температуре воздуха $23 \pm 1^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 75% и освещенности

3000 лк. Растворы, используемые для полива, ежедневно меняли на свежие. На 7-ой день эксперимента регистрировали изменение массы и длины надземных и подземных органов, а также проводили биохимические анализы по определению активности перекисного окисления липидов (ПОЛ), содержание пролина, интенсивность супероксиддисмутазы (СОД), содержание супероксидрадикала (СОР), перекиси водорода в листьях проростков пшеницы.

Важным показателем физиологического состояния растительного организма является рост растений и размеры его надземной части и корневой системы. По данным табл.1 проращивание семян пшеницы на растворе CdSO_4 с концентрацией 10^{-3}М способствовало достоверному уменьшению массы и длины побега проростков на 32% и 18% соответственно. Также наблюдалось торможение роста корневой системы: длина корня под действием CdSO_4 уменьшилась на 46%, а масса – на 52%. Подобные изменения в присутствии высоких концентраций солей кадмия многие исследователи объясняют торможением митотических делений клеток, увеличением продолжительности всех фаз митоза и всего митотического цикла. Ионы кадмия нарушают нормальное течение митозов, так как обладают высоким сродством к белкам веретена деления клеток. Также нарушается рост клеток растяжением вследствие снижения эластичности клеточных стенок и нарушения проницаемости мембран из-за окислительного стресса, вызванного образованием в мембранах активных форм кислорода (АФК).

Таблица 1

Влияние предпосевной обработки семян пшеницы CNa на ростовые показатели 7-дневных проростков пшеницы, подвергнутых действию $\text{CdSO}_4 10^{-3}\text{М}$

Серия опытов	Побег		Корень	
	Масса (мг)	Длина (мм)	Масса (мг)	Длина (мм)
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	$84 \pm 2,5$	$155 \pm 3,1$	$48 \pm 4,7$	$135 \pm 3,8$
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CdSO}_4$	$57 \pm 3,3^*$	$127 \pm 3,0^*$	$23 \pm 2,8^*$	$73 \pm 2,0^*$
$0,1\text{мМ CNa} \rightarrow \text{CdSO}_4$	$82 \pm 3,6^{**}$	$146 \pm 3,5^{**}$	$31 \pm 2,6^*$	$69 \pm 2,9^*$
$0,5\text{мМ CNa} \rightarrow \text{CdSO}_4$	$70 \pm 2,5^*$	$121 \pm 2,5^*$	$24 \pm 2,1^*$	$50 \pm 2,5^* **$
$1,0\text{мМ CNa} \rightarrow \text{CdSO}_4$	$66 \pm 3,7^*$	$119 \pm 2,4^*$	$19 \pm 3,1^*$	$37 \pm 2,8^* **$
$5,0\text{мМ CNa} \rightarrow \text{CdSO}_4$	$45 \pm 3,4^*$	$115 \pm 3,2^* **$	$17 \pm 3,6^*$	$20 \pm 2,0^* **$

Примечание: здесь и далее звездочкой обозначены статистически значимые различия. * - $P < 0,05$ относительно дистиллированной воды; ** $P < 0,05$ относительно CdSO_4 .

Обработка семян пшеницы CNa с концентрацией 0,1 мМ в течение 2-х суток уменьшила отрицательный эффект CdSO_4 . Особенно это заметно на побеге, поскольку значения массы и длины побега практически не отличались от контрольных значений. Длина и масса корней также несколько увеличились, но уровня контроля не они не достигли. Полученные результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные о том, что

низкие концентрации СК являются благоприятными для растений и могут нивелировать негативное действие ТМ на рост и развитие растений.

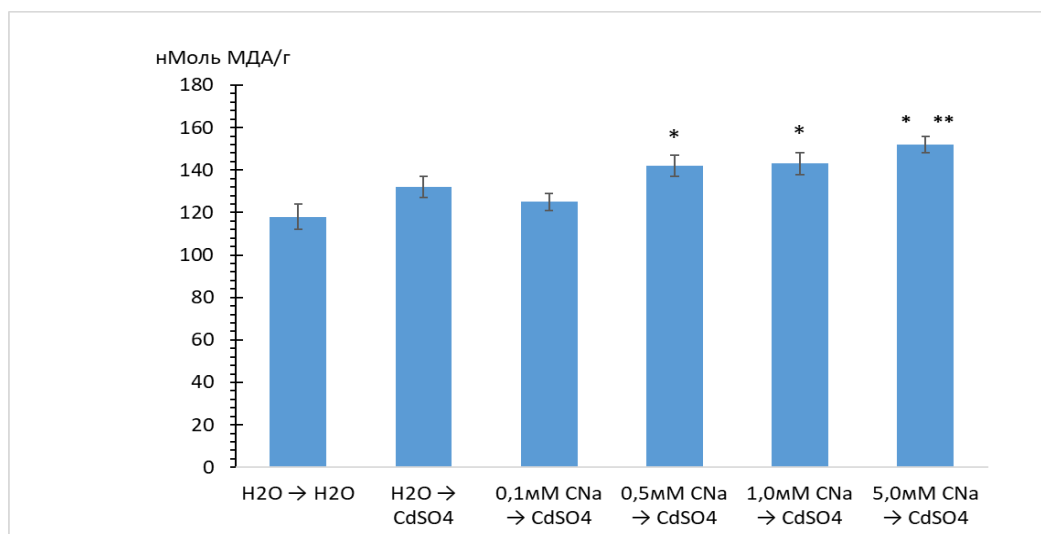


Рис. 1. Влияние предпосевной обработки семян пшеницы CNa на интенсивность ПОЛ в листьях 7-дневных проростков пшеницы, подвергнутых действию CdSO₄ 10⁻³М

Концентрации CNa 0,5 – 5,0 мМ на фоне действия 10⁻³М CdSO₄ вызывали торможение роста как наземной, так и подземной частей проростков тем больше, чем больше была концентрация CNa. Токсическое действие кадмия в большей степени проявлялось в отношении роста корней по сравнению с побегом. Так, при концентрации CNa 5,0 мМ масса и длина корня по сравнению с контролем были меньше соответственно на 65% и 85%, а побега – соответственно на 46% и 26%. Возможно, посредником в реализации эффектов CNa выступают АФК, образование которых увеличивается при высоких концентрациях CNa.

При действии различных стрессовых факторов на растения, в том числе и ТМ, наблюдается усиленная генерация АФК, проявляющаяся в первую очередь в виде усиления ПОЛ. Об уровне ПОЛ в клетках растений судят по накоплению малонового диальдегида (МДА). В листьях проростков пшеницы, обработанных кадмием, наблюдалось увеличение интенсивности ПОЛ, что отражалось в росте количества образовавшегося МДА – на 12% выше контрольного значения (рис.1). Предобработка семян 0,1 мМ раствором CNa способствовала незначительному снижению уровня ПОЛ (с 132 нМоль/г до 125 нМоль/г). Более высокие концентрации CNa (0,5мМ и 1,0мМ) вызывали усиление процессов свободнорадикального окисления липидов и накопления продуктов ПОЛ на 20% и на 21% достоверно выше по сравнению с контролем. Самая высокая интенсивность ПОЛ наблюдалась при предобработке семян CNa в концентрации

5,0 мМ и последующем действии кадмия. В этой серии опытов количество образовавшегося МДА было достоверно выше контрольных значений на 29%. Повышение уровня МДА свидетельствует об усилении окислительного стресса в клетках под действием кадмия и высоких концентраций СNa.

Одним из ранних ответов растений на действие ТМ является образование пероксида водорода, одной из АФК, которая выполняет функцию сигнальной молекулы, так как легко проникает через мембраны и относительно долго не разрушается. 10^{-3}M CdSO_4 вызывает достоверное увеличение (на 18%) содержания H_2O_2 в листьях проростков пшеницы по сравнению с контролем (рис. 2, а). Предварительная обработка семян раствором СNa с концентрацией 0,1 мМ снизила содержание пероксида водорода почти до уровня контрольных значений. Дальнейшее повышение концентрации СNa приводило к значительному повышению уровня H_2O_2 и по сравнению с контролем (на 53%), и по сравнению с действием только кадмия (на 30%) при концентрации СNa 5,0 мМ. Эти результаты показывают, что концентрации СNa 0,5 мМ и выше вызывают усиление окислительного стресса, вызванного действием ТМ. Считается, что одним из механизмов реализации эффектов СК является ингибирование фермента каталазы, в результате чего в клетках накапливается H_2O_2 . Более детальное исследование данного механизма показало, что образование пероксида водорода происходит при высоких концентрациях СК, с чем хорошо согласуются и наши данные.

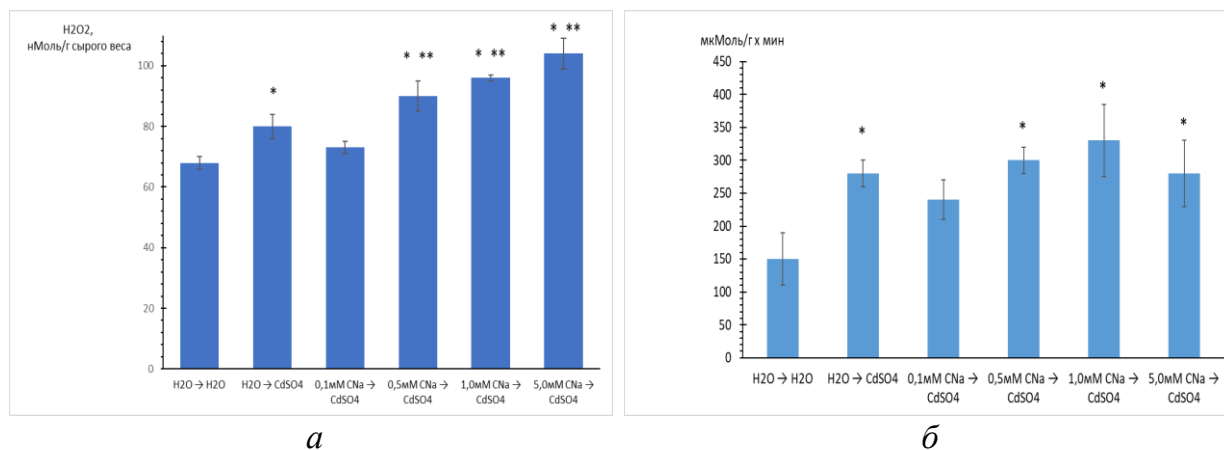


Рис. 2. Влияние предпосевной обработки семян пшеницы СNa на содержание H_2O_2 (а) и скорость генерации СОР (б) в листьях 7-дневных проростков пшеницы, подвергнутых действию CdSO_4 10^{-3}M

Изменение скорости генерации супероксидного анион радикала (СОР) представлены на рис 2 б. Ионы кадмия повышали скорость генерации O_2^{*-}

на 87%. Предобработка семян пшеницы 0,1 мМ CNa привела к незначительному снижению интенсивности генерации СОР. С увеличением концентрации CNa скорость генерации СОР увеличивалась и была максимальной при концентрации CNa 1,0мМ (на 83% выше контрольных значений). В данном эксперименте CNa не оказывал выраженного антиоксидантного действия, а, наоборот, выступал в роли прооксиданта, усиливая генерацию СОР.

Таблица 2

Влияние предпосевной обработки CNa на уровень пролина и активность СОД в листьях 7-дневных проростков пшеницы при действии 10^{-3} М CdSO₄

Серия опытов	Содержание пролина (мкМоль/г сырой массы)	Активность СОД (услов. един/мг сырой массы)
H ₂ O → H ₂ O	1,20 ± 0,02	0,32 ± 0,030
H ₂ O → CdSO ₄	1,32 ± 0,06	0,46 ± 0,016*
0,1мМ CNa → CdSO ₄	1,34 ± 0,03*	0,51 ± 0,018* **
0,5мМ CNa → CdSO ₄	1,41 ± 0,05*	0,48 ± 0,015*
1,0мМ CNa → CdSO ₄	1,52 ± 0,04* **	0,42 ± 0,035*
5,0мМ CNa → CdSO ₄	1,61 ± 0,05* **	0,40 ± 0,013*

Аминокислоту пролин в последнее время относят к многофункциональным метаболитам растений, которая, помимо осмопротекторной, шаперонной, сигнально-регуляторной, выполняет еще и антиоксидантную функцию. Согласно данным табл. 2 в листьях проростков пшеницы, подвергнутых действию 10^{-3} М CdSO₄, содержание пролина оставалось практически на уровне контроля, что может свидетельствовать о его расходовании на «тушение» АФК и выполнение других протекторных функций. С увеличением концентрации CNa в среде культивирования семян увеличивалось и содержание пролина. Самое высокое накопление пролина (на 34% по сравнению с контролем) было при концентрации CNa 5,0 мМ. Следовательно, предобработка семян пшеницы растворами CNa приводила к существенному увеличению содержания пролина в клетках листьев проростков. Если принять во внимание тот факт, что критерием окислительного стресса является количество образовавшегося продукта ПОЛ – МДА, то можно прийти к заключению, что CNa в концентрации 0,1 мМ выполняет функцию антиоксиданта. Все остальные более высокие концентрации являются прооксидантами, стимулируя окислительный стресс в клетках листьев пшеницы, вызванный действием соли кадмия. Причинами накопления пролина при совместном действии CNa и CdSO₄ могут быть торможение процесса окисления пролина или ограничение его включения в белки.

Ключевым ферментом антиоксидантной системы является супероксиддисмутаза (СОД). Фермент катализирует реакцию нейтрализации СОР

с образованием пероксида водорода. По данным табл. 2 ионы кадмия вызывали достоверное повышение СОД (на 44% по сравнению с контролем). С этими результатами хорошо согласуется повышенное содержание H_2O_2 (рис. 2), продукта дисмутации СОР. Следовательно, ионы кадмия вызывают усиление всего каскада свободнорадикальных реакций. Обработка семян пшеницы растворами CNa с концентрацией 0,1 мМ вызывала достоверное увеличение активности фермента как против контроля (действие дистиллированной воды), так и против серии с вариантом с CdSO_4 . В этих же условиях содержание пероксида водорода и СОР возвращалось к контрольному уровню. Это может свидетельствовать о том, что именно превращение СОР в H_2O_2 происходило путем реакции дисмутации, осуществляемой ферментом СОД, а последующее снижение содержания пероксида водорода происходило в результате активации фермента каталазы, разлагающей H_2O_2 до H_2O и O_2 .

Концентрации CNa 0,5 мМ - 5,0 мМ не изменили активность СОД по сравнению с вариантом действия CdSO_4 . Увеличение концентрации H_2O_2 в этих условиях может приводить к подавлению активности фермента СОД, так как известно, что пероксид водорода является ингибитором фермента СОД.

Кроме того, в наших исследованиях выявлена обратно-коррелятивная зависимость между активностью СОД и эндогенным уровнем пролина при совместном действии CdSO_4 и высоких концентрациях CNa . Обнаруженная закономерность отмечалась в ранее проведенных исследованиях на других растительных объектах [Радюкина и др., 2008].

Проведенное исследование позволило установить, что СК в растительных организмах в зависимости от концентрации может выполнять двоякую функцию. Первая – защитная, которая проявляется через реализацию его антиоксидантных свойств при концентрациях CNa 0,1 мМ и ниже. В результате наблюдаются изменения физиологических и биохимических процессов, приводящих к стимуляции процессов роста. Одновременно с этим растения воспринимают обработку CNa в низкой концентрации как предупреждение о надвигающейся угрозе и запускают механизм пре-адаптации к последующим стрессам. Вторая функция CNa , которая проявляется при концентрации 0,5 мМ и выше, – это прооксидантная, когда фитогормон вызывает усиление продукции АФК и контролирует последующую активацию антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных протекторных молекул, таких как пролин.

Полученные данные свидетельствуют о сложной организации регулирования обменных процессов и защитных механизмов растений с участием СК.

Библиографические ссылки

1. Колупаев Ю.Е., Ястреб Е.О., Поляков А.П. Салициловая кислота и формирование адаптивных реакций растений на абиотические стрессы: роль компонентов сигнальной сети. Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2021. - №55.- С.135-165.
2. Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. - С. 194.
3. Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата. Физиология растений. – 2008. – том 55, №5, С. 721-730.

Влияние 24-эпибрассинолида на состояние про-/антиоксидантной системы у различающихся по стратегии адаптации к засухе экотипов пшеницы в условиях дефицита влаги

**Авальбаев А. М.^{А*}, Юлдашев Р. А.^А, Плотников А. А.^А,
Якупова А. И.^А, Коряков И. С.^А, Аллагулова Ч. Р.^А**

^А *Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, лаборатория молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам, Уфа, Россия, *E-mail: avalbaev@yahoo.com*

Одной из актуальных проблем современной науки о растениях является исследование механизмов устойчивости растительных организмов к засухе, приводящей к нарушению всех звеньев метаболизма и потере продуктивности культурных растений, в том числе и пшеницы. Растения пшеницы особенно чувствительны к действию дефицита влаги в ходе начального этапа онтогенеза. На ранних этапах развития засуха ингибирует всхожесть семян, тормозит прорастание и рост всходов, что в дальнейшем приводит к отставанию пшеницы в развитии и, в конце концов, к существенному снижению ее урожайности. В ходе естественного и искусственного отборов в зависимости от времени наступления засухи у пшеницы сформировались две различающиеся по стратегии адаптации к засухе эколого-географические группы – степной волжский и лесостепной западносибирский экотипы, которые в нашем исследовании представлены сортами Экада 70 (Э-70) и Зауральская Жемчужина (ЗЖ). Особенно заметны различия у растений обоих экотипов на начальном этапе онтогенеза растений. Для растений степного волжского экотипа характерен активный рост и засухоустойчивость на начальных стадиях онтогенеза в отличие от представителей лесостепного западносибирского экотипа, которые отличаются замедленным ростом и сниженной засухоустойчивостью. Вместе с тем, регуляторам роста, в частности брассиностероидам, отводится важная роль в повышении засухоустойчивости растений пшеницы. Хорошо известно, что в результате негативного влияния внешних факторов, в том

числе и засухи, в растениях развивается окислительный стресс, возникающий вследствие избыточной генерации активных форм кислорода (АФК). Нами был проведен анализ влияния 24-эпибрассинолида (ЭБ) на состояние про/антиоксидантной системы у растений пшеницы сортов Э-70 и ЗЖ на начальном этапе онтогенеза (возраст 7-9 суток) в условиях обезвоживания. Засуха вызвала значительное увеличение концентрации супероксид аниона и перекиси водорода в проростках обоих сортов, что сопровождалось возрастанием активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и пероксидазы. Стоит отметить, что стресс-индуцированная продукция АФК была ниже, а уровень активации антиоксидантных ферментов был выше у сорта Э-70 степного волжского экотипа, что, по-видимому, позволяло проросткам этого сорта более успешно справляться с последствиями засухи на раннем этапе онтогенеза. На это указывают и более низкие показатели повреждения мембранных структур у растений сорта Э-70 – малонового диальдегида (МДА) и выхода электролитов из тканей. Таким образом, растениям степного волжского экотипа характерна более высокая засухоустойчивость в начальный этап онтогенеза в сравнении с представителями лесостепного западносибирского экотипа, что может быть обусловлено их более мощной антиоксидантной системой, приводящей к меньшим нарушениям метаболизма. Как уже отмечалось, важную роль в повышении устойчивости растений к засухе играют регуляторы роста, в особенности те, которые сочетают в своем действии ростстимулирующую и антистрессовую активности, в частности, фитогормоны брассиностероиды. Поэтому, далее мы провели анализ действия предпосевной обработки 24-эпибрассинолидом на уровень прооксидантов, активность антиоксидантных ферментов, уровень МДА и экзосмос электролитов в тканях предобработанных и необработанных ЭБ растений пшеницы сортов исследуемых экотипов в условиях дефицита влаги. Предобработанные ЭБ проростки сорта Э-70 степного волжского экотипа характеризовались существенно меньшим уровнем стресс-индуцированного накопления супероксид аниона и перекиси водорода, меньшей активацией супероксиддисмутазы и пероксидазы и, соответственно, меньшим уровнем повреждающего действия засухи на показатели МДА и выхода электролитов в сравнении с необработанными гормоном. Вместе с тем, предпосевная обработка ЭБ практически не оказала влияния на исследуемые показатели проростков ЗЖ – в предобработанных гормоном растениях не наблюдалось снижения индуцируемого засухой накопления АФК и показателей повреждения мембранных структур, что свидетельствует об отсутствии протекторного эффекта гормона на растения данного сорта. Таким образом, предобработка 24-эпибрассинолидом оказывала выраженное защитное действие на проростки сорта Экада 70 степного волжского

экотипа в сравнении с растениями Зауральская Жемчужина лесостепного западносибирского экотипа, что связано с активацией системы антиоксидантной защиты в растениях Э-70 под влиянием этого фитогормона.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00246, <https://rscf.ru/project/23-26-00246/>

Исследование влияния хитозана на метаболизм зелёной водоросли в целях разработки экологически чистого метода борьбы с излишним разрастанием водорослей в водоёмах

Агеева И. В.^{А*}, Власова Т. А.^В

^А *Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, кафедра общей экологии и гидробиологии, Москва, Россия.*

^В *Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, кафедра физиологии растений, Москва, Россия, *E-mail: tat_vla@list.ru*

Проблема борьбы с обрастаниями подводных сооружений, таких как платформы и корабли, а также с “цветением” водоёмов весьма актуальна. С этой целью применяются различные покрытия, но входящие в них вещества обычно ядовиты и медленно разлагаются. В связи с этим в последнее время весьма активно изучается природный полимер хитозан. Хитозан представляет собой высокомолекулярный полимер глюкозамина, N-деацетилированное производное хитина. В отличие от практически нерастворимого хитина, хитозан растворим и может применяться в широких областях промышленности и сельского хозяйства. Он достаточно эффективно улучшает физиологические свойства высших растений и благотворно влияет на них в условиях биотического и абиотического стрессов. Кроме того, хитозан является природным биофунгицидом, биобактерицидом и биовируцидом, благодаря чему рассматривается как потенциальный агент защиты растений от патогенов. Как высоконенасыщенный полимер, хитозан способен генерировать активные формы кислорода и проявлять антиоксидантные свойства. Благодаря катионной природе хитозан может взаимодействовать с анионными компонентами биомембран и клеточных стенок, как фосфолипиды и пектины. Известно, что взаимодействие хитозана с полярными группами фосфолипидов плазмалеммы приводит к усилению проницаемости клеточных мембран. При повышении концентрации хитозана, при увеличении степени его полимеризации проницаемость мембран увеличивается, что приводит к гибели клеток. Этому способствует увеличение активности АФК в среде, таких как синглетный кислород, супероксидный анион радикал, перекись водорода и др. Окислитель-

ный взрыв, образование супероксидного и гидроксидного свободных радикалов, перекиси водорода, синглетного кислорода оказывает токсическое действие на клетку, индуцируя деструктивные процессы в клеточных мембранах.

Представляет большой интерес изучение возможности использования бактерицидных и бактериостатических свойств хитозана. Объектом исследования была выбрана альгологически чистая культура зелёной водоросли *Scenedesmus quadricauda*, которую выращивали в присутствии хитозановых гранул с высокой пористостью.

Было показано, что используемый хитозан подавлял рост культуры водоросли. Обнаружено было также понижение содержания хлорофилла в клетках. В присутствии хитозана в водной среде быстро окисляются органические молекулы, появляются свободные радикалы. При этом содержание в ней микроорганизмов снижается на порядок. Изучение состояния культуры *S. quadricauda* с применением флуоресцентной микроскопии выявило высокий процент мёртвых клеток. Обнаружено было также понижение содержания хлорофилла. На протяжении всего периода культивирования наблюдалось увеличение концентрации выделенных метаболитов в среде, что, как известно, отрицательно влияет на рост культуры. Подавление роста культуры вызывается воздействием хитозана как на поверхностные, так и на внутриклеточные структуры водоросли.

Результаты исследования показывают, что применение хитозана довольно перспективно для предотвращения последствий излишнего роста водорослей в водоёмах.

Антиоксидантный потенциал культур *Camellia sinensis* L. в условиях действия фенольных предшественников

Аксенова М. А.^{А*}, Нечаева Т. Л.^А, Загоскина Н. В.^А

^А Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Россия, Москва. *E-mail: akse.masha@yandex.ru

Растениям для поддержания жизнедеятельности необходимы свет и кислород [1,2]. Они регулируют различные метаболические процессы, в том числе за счет образования/инактивации активных форм кислорода (АФК). В оптимальных условиях эти молекулы образуются в небольших количествах, а при стрессовых воздействиях их уровень значительно повышается и может даже сопровождаться «окислительным взрывом» — губительным для клеток. Поддержание баланса между образованием и инактивацией АФК обусловлено функциональной активностью их антиокси-

дантной системы (АС), основными компонентами которой являются высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты (АО). Все они, присутствуя в меньших концентрациях по сравнению с окисленным субстратом, значительно задерживают или ингибируют его окисление. Высокомолекулярные АО представлены различными ферментами, такими как супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза, каталаза и другие, и их считают “первой” линией защиты растительных клеток от окислительного стресса. К низкомолекулярным АО относят различные соединения первичного и вторичного метаболизма растений, в том числе фенольные соединения (ФС), которые представляют уже “вторую” линию защиты. При этом накопление низкомолекулярных метаболитов фенольной природы имеет и практическое значение, поскольку многие их представители могут использоваться в качестве фармакологически ценных препаратов. В связи с этим, проводятся разнообразные исследования по регуляции накопления ФС в растительных клетках, в том числе при помощи соединений - предшественников их биосинтеза [2,3].

Целью работы было изучение образования высокомолекулярных (супероксиддисмутаза и пероксидаза) и низкомолекулярных (фенольные соединения, включая флаванолы и проантоцианидины) антиоксидантов в каллусной культуре *Camellia sinensis* L. в условиях действия таких предшественников как *L*-фенилаланин (ФА), *транс*-коричная кислота (КК) и нарингенин (НГ).

Объектом исследования являлась гетеротрофная каллусная культура чайного растения (*Camellia sinensis* L., грузинская популяция). Каллусы выращивали на питательной среде Хеллера (5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 25 г/л глюкозы, 7 г/л агара) в условиях факторостата ИФР РАН (25°C, относительная влажность воздуха 70%, темнота 24 часа) [4]. Продолжительность пассажа составляла 39 дней. При постановке опыта каллусные культуры переносили в жидкую питательную среду Хеллера основного состава (контроль) или содержащую ФА, КК и НГ (3, 1 и 0,5 мМ, соответственно) и ставили на ротерную качалку (90 об./мин). Длительность культивирования – 7 дней.

Оводненность каллусов чая определяли по стандартной методике [5]. Уровень перекисного окисления липидов оценивали по реакции с тиобарбитуровой кислотой, определяя содержание малонилового диальдегида (МДА) [6]. Активность супероксиддисмутазы определяли по реакции восстановления нитросинего тетразолия до формазана при участии супероксидных радикалов, образующих систему окисления рибофлавина [7]. Активность пероксидазы оценивали по образованию продукта реакции – тетрагваякола (ТГ) [8]. ФС экстрагировали из растительного материала

96%-ным этанолом [9]. Определение суммарного содержания ФС проводили с реактивом Фолина–Чокалтеу при 725 нм и выражали в мг экв. галловой кислоты (ГК)/ г сухой массы [10]. Количество флаванолов определяли с ванилиновым реактивом при 500 нм и выражали в мг экв. эпикатехина (ЭК)/ г сухой массы [10]. Проантоцианидины определяли с бутанольным реагентом при 550 нм и выражали в мг экв. цианидина (Ц)/ г сухой массы [10].

Сравнение морфологических параметров культур растений *in vitro*, подвергшихся воздействию экзогенных факторов, является важным показателем оценки их физиологического состояния. Каллусные культуры чая, выращенные на жидкой питательной среде, были компактными, достаточно плотными и имели бежевый цвет. На основной питательной среде или на среде с добавлением ФА они имели светло-бежевый цвет. На среде с НГ каллусы были более темного цвета, а на среде с КК - более плотными и темно-бежевыми. Все это указывает на незначительные различия в морфологии каллусных культур чая, выращенных на средах с различными предшественниками ФС, относительно контроля.

Определение содержания воды в каллусной культуре чая не выявило существенных различий между вариантами (табл. 1). Можно отметить статистически значимое его увеличение (на 2%) в культуре только при действии НГ. Следует подчеркнуть, что изменение этого параметра в пределах 5% не свидетельствует о существенных изменениях физиологических процессов клеток. Описанный эффект НГ подтверждается данными, полученными в работе Sharma et al., где была отмечена аналогичная тенденция [11]. Согласно нашим данным, содержание МДА как показателя уровня ПОЛ было статистически равным в каллусах контрольного варианта и тех, которые подвергались обработке ФА и КК (табл. 1). Единственным исключением был вариант с действием НГ, где уровень ПОЛ был в два раза выше контрольного. Полученные нами данные находят свое подтверждение в ряде работ. Так, на примере растений томата не было выявлено статистически значимых изменений уровня ПОЛ при воздействии ФА [12]. Обработка КК не привела к существенным изменениям этого показателя у проростков *Cucurbita ficifolia* [13]. Также имеются данные об обработке НГ проростков *Carthamus tinctorius*, которые аналогичны полученным нами результатам [14].

Таблица 1

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), активности супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы (ПО), суммы фенольных соединений (СФС), фенилпропаноидов (ФП) и флаванов (ФЛ) в каллусных культурах чая, выращиваемых в течение 7 дней на жидкой питательной среде Хеллера основного состава (контроль) или обогащенной L-фенилаланином (ФА; 3 мМ), транс-коричной кислотой (КК; 1 мМ) или нарингенином (НГ; 0,5 мМ)

Параметры	Вариант			
	Контроль	ФА	КК	НГ
ПОЛ, мкМ МДА/ г сух. массы	44.48±6.83 ^b	50.27 ± 2.55 ^b	55.83 ± 9.07 ^b	86.63 ± 10.29 ^a
СОД, ед-ца акт- ти/мг белка	10.67 ± 2.01 ^b	11.48 ± 0.52 ^b	1.06 ± 0.10 ^c	24.23± 0.48 ^a
ПО, мМ ТГ/ мг белка/ мин	70.18 ± 0.71 ^a	60.15 ± 2.90 ^b	53.47 ± 1.67 ^c	43.44 ± 4.43 ^d
СФС, мг экв. ГК/ г сух. массы	7.86 ± 0.71 ^d	16.11 ± 0.71 ^a	9.64 ± 1.03 ^c	14.1 ± 1.07 ^b
ФЛ, мг экв. ЭК/ г сух. массы	4.69 ± 0.49 ^d	13.21 ± 0.88 ^a	8.36 ± 0.78 ^c	10.91 ± 0.55 ^b
ПА, мг экв. Ц/ г сух. массы	12.69 ± 2.32 ^c	29.33 ± 2.33 ^a	20.65 ± 1.67 ^b	27.77 ± 1.03 ^a

СОД считается одним из основных высокомолекулярных антиоксидантов растительных клеток и даже “первичной” линией их защиты от окислительного повреждения. Этот фермент предотвращает окисление макромолекул супероксидными радикалами [1]. Определение активности СОД в каллусных культурах чая выявило статистически значимые различия между контрольным и двумя экспериментальными вариантами (КК и НГ) (табл. 1). Под действием КК активность СОД не превышала таковую контроля и даже была минимальной, что в определенной степени коррелирует с данными по проросткам *Cucumis sativus*, где отмечено отсутствие изменений в активности фермента [13]. При этом наибольшая активность СОД была отмечена в каллусах, выращенных на среде с НГ, где она была почти в 2,5 раза выше, чем в контрольном варианте. Есть несколько работ, подтверждающих эти данные: небольшое, но статистически значимое повышение активности этого фермента было показано у проростков *Carthamus tinctorius* [14]. Что касается каллусов, подвергшихся воздействию ФА, то активность СОД была статистически равна значениям в контроле.

Наши исследования также показали, что активность ПО – фермента, участвующего в детоксикации одной из форм АФК (H_2O_2) – была самой высокой в культуре клеток чая контрольного варианта (табл. 1). В экспериментальных вариантах наблюдалась статистически значимая тенденция

к снижению активности ПО в ряду: Контроль-ФА-КК-НГ. При чем в культуре клеток чая, выращенной на среде с ФА, оно составило 15%, на среде с КК – 24% и на среде с НГ – 40%. Все это свидетельствуют об уменьшении активности ПО при выращивании каллусных культур чая на среде с различными фенольными предшественниками. Аналогичная тенденция была отмечена для проростков *Phaseolus vulgaris*, у которых после воздействия НГ активность данного фермента сократилась почти в три раза по сравнению с контролем [15]. На примере проростков *Cucurbita ficifolia* было показано, что обработка КК не приводила к статистически значимым изменениям активности ПО, также как и обработка ФА, которая не влияла на этот показатель в листьях томатов [12,13].

ФС являются одними из эффективных низкомолекулярных антиоксидантов, которые считаются “второй” линией защиты растительных клеток от действия АФК. Благодаря своим химическим свойствам они взаимодействуют с активными формами кислорода, тем самым снижая их токсическое воздействие на клетки [9].

Определение общего содержания ФС в каллусных культурах чая является важным показателем для оценки их способности накапливать эти вторичные метаболиты. Согласно полученным данным, при выращивании культур клеток на средах с фенольными предшественниками общее содержание ФС было значительно выше, чем в контроле (табл. 2). Наибольшее увеличение этого параметра было отмечено на среде с ФА, когда оно превышало контрольные данные в два раза, что коррелирует с данными на примере листьев *Cicer arietinum* и каллусной культуры *Sequoia sempervirens* [16]. В присутствии НГ содержание ФС увеличивалось на 79%, а в культуре клеток чая, обработанной КК, — на 23% по сравнению с контрольными значениями. Имеются данные, подтверждающие увеличение накопления ФС в проростках *Carthamus tinctorius* и *Vigna radiata* в присутствии НГ, при этом в первом случае этот показатель увеличивался почти в два раза [11,14].

Основными компонентами фенольного комплекса не только чайного растения, но и полученных из него культур *in vitro*, являются флаванолы, которые в последние годы также считаются веществами, обладающими антиоксидантной активностью [4]. Согласно полученным данным, поступление всех фенольных предшественников в каллусы чая способствовало активации фенольного метаболизма, что сопровождалось накоплением характерных для них флаванолов (табл. 1). В то же время наиболее эффективными “регуляторами” этого процесса были ФА (увеличение на 150%) – участник начальных стадий биогенеза ФС, а также НГ (превышение на 130%) — важный промежуточный продукт флавоноидного пути.

На примере листьев *Triticum aestivum* также было показано значительное увеличение содержания флаванолов в присутствии ФА [3].

Чайное растение и каллусные культуры, полученные из него, характеризуются образованием олигомерных форм ФС — проантоцианидинов [4]. Определение их содержания в культурах клеток чая показало стимулирующий эффект всех предшественников (табл. 1). Наибольшее его количество отмечалось в каллусах, выращенных на средах с ФА и НГ, которые почти в равной степени превышали значения контрольного варианта (в 2,3 и 2,2 раза соответственно). Полученные нами данные о действии ФА подтверждены на примере листьев пшеницы [3]. В то же время действие КК увеличивало содержание этих соединений всего в 1,6 раза по сравнению с контрольным вариантом.

Что касается индивидуального эффекта каждого предшественника, то повышающий эффект ФА был наиболее выражен для всех классов ФС. Обработка НГ, в свою очередь, оказала аналогичный эффект, но он был менее выражен. В то время как обработка КК оказала наименьшее влияние на эти параметры.

Все вышесказанное свидетельствует о том, что культивирование каллусной культуры чая на средах с различными предшественниками сопровождалось увеличением накопления в них низкомолекулярных фенольных антиоксидантов, в том числе флаванолов — веществ, обладающих Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью.

Антиоксидантная система играет важную роль в сохранении жизнедеятельности растений, а также в их адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Их основными компонентами являются высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты, баланс которых определяет наличие активных форм кислорода в клетке и их детоксикацию. При этом высокомолекулярные антиоксиданты, представленные различными ферментами, считаются первой линией защиты, а низкомолекулярные — второй и, возможно, дополнительной, функциональная активность которых проявляется на более поздней стадии воздействия различных факторов. И этот тезис полностью соответствует данным, полученным нами для культур клеток чая. После воздействия различных предшественников наблюдалось изменение активности ферментативных антиоксидантов. При этом активность СОД различалась в двух вариантах опыта: обработка КК способствовала ее снижению, в то время как обработка НГ повышала ее. Что касается активности ПО, то при воздействии предшественников она всегда была ниже, чем в контрольном варианте. Однако увеличивалось накопление низкомолекулярных антиоксидантов фенольной при-

роды. Возможно, именно накопление этих метаболитов послужило основой для поддержания уровня ПОЛ в большинстве изученных вариантов обработки на уровне контроля.

Важно также отметить тот факт, что, используя различные предшественники ФС в качестве компонентов питательных сред для выращивания культур растительных клеток, можно в определенной степени регулировать накопление в них веществ, обладающих антиоксидантной активностью, в частности полифенолов. Для каллусных культур чая наиболее перспективным регулятором их накопления был ФА, в присутствии которого их содержание увеличивалось почти в два раза и проявлялось не только на уровне общего содержания этих метаболитов, но и на уровне флаванолов — веществ, обладающих Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью.

Библиографические ссылки

1. Yadav, A., Singh, D., Lingwan, M., Yadukrishnan, P., Masakapalli, S. K., Datta, S. Light signaling and UV-B-mediated plant growth regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(9), 1270-1292.
2. Considine, M. J., & Foyer, C. H. Oxygen and reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Plant Physiology*, 2021, 186(1), 79-92.
3. Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, B.; Zulfikar, F.; Raza, A.; Mohsin, S.; Mahmud, J.; Fujita, M.; Fotopoulos, V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 2020, 9, 681.
4. Chandran, H.; Meena, M.; Barupal, T.; Sharma, K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep.* 2020, 26, e00450.
5. Feduraev, P.; Skrypnik, L.; Riabova, A.; Pungin, A.; Tokupova, E.; Maslennikov, P.; Chupakhina, G. Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*Triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways. *Plants* 2020, 9, 476.
6. Zubova, M.; Nechaeva, T.; Kartashov, A.; Zagorskina, N. Regulation of the phenolic compounds accumulation in the tea-plant callus culture with a separate and combined effect of light and cadmium ions. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2020, 47, 593–604.
7. Tomilova, S.V.; Kochkin, D.V.; Tyurina, T.M.; Glagoleva, E.S.; Labunskaya, E.A.; Galishev, B.A.; Nosov, A.M. Growth and biosynthetic profiles of callus and suspension cell cultures of two rare foxglove species, *Digitalis grandiflora* Mill. and *D. ciliata* Trautv. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* 2022, 149, 213–224.
8. Senthilkumar, M.; Amaresan, N.; Sankaranarayanan, A. Estimation of malondialdehyde (MDA) by thiobarbituric acid (TBA) assay. In *Plant-Microbe Interactions*; Springer Protocols Handbooks: New York, NY, USA, 2021; pp. 103–105.
9. Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971, 44, 276–287.
10. Henry, E.W.; Jordan, W.; III. The enzymic response of pea (*Pisum sativum*) stem sections to applied indoleacetic acid, gibberellic acid and ethrel: Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase. *Z. Für Pflanzenphysiol.* 1977, 84, 321–327.

11. Kumar, S.; Abedin, M.M.; Singh, A.K.; Das, S. Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. In *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*; Springer Nature: Singapore, 2020; Volume 1, pp. 517–532.
12. Goncharuk, E.A.; Zubova, M.Y.; Nechaeva, T.L.; Kazantseva, V.V.; Gulevich, A.A.; Baranova, E.N.; Lapshin, P.V.; Katanskaya, V.M.; Aksenova, M.A.; Zagorskina, N.V. Effects of Hydrogen Peroxide on In Vitro Cultures of Tea (*Camellia sinensis* L.) Grown in the Dark and in the Light: Morphology, Content of Malondialdehyde, and Accumulation of Various Polyphenols. *Molecules* 2022, 27, 6674.
13. Sharma, P.; Gautam, A.; Kumar, V.; Khosla, R.; Guleria, P. Naringenin reduces Cd-induced toxicity in *Vigna radiata* (mungbean). *Plant Stress* 2021, 1, 100005.
14. Almas, H.I.; un-Nisa, Z.; Anwar, S.; Kausar, A.; Farhat, F.; Munawar, M.; Khalizadieh, R. Exogenous application of methionine and phenylalanine confers salinity tolerance in tomato by concerted regulation of metabolites and antioxidants. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2021, 21, 3051–3064.
15. Ding, J.U.; Sun, Y.; Xiao, C.L.; Shi, K.; Zhou, Y.H.; Yu, J.Q. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *J. Exp. Bot.* 2007, 58, 3765–3773.
16. Hatamipoor, S.; Shabani, L.; Farhadian, S. Supportive effect of naringenin on NaCl-induced toxicity in *Carthamus tinctorius* seedlings. *Int. J. Phytoremediation* 2023, 25, 889–899.
17. Ozfidan-Konakci, C.; Yildiztugay, E.; Alp, F.N.; Kucukoduk, M.; Turkan, I. Naringenin induces tolerance to salt/osmotic stress through the regulation of nitrogen metabolism, cellular redox and ROS scavenging capacity in bean plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2020, 157, 264–275.
18. Kolupaev, Y.E.; Horielova, E.I.; Yastreb, T.O.; Ryabchun, N.I. State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. *Cereal Res. Commun.* 2020, 48, 165–171.

Анализ воздействия антигололедных реагентов на ростовые процессы высших растений и синтез АФК в клетках корня

**Алексеева М. И.^{A*}, Черныш М. А.^A, Мацкевич В. С.^A,
Демидчик В. В.^A**

^A Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, г. Минск, Беларусь. *E-mail: aliakseyeva_mi@mail.ru.

Основной причиной солевого стресса в городских условиях является использование антигололедных реагентов в зимний период времени в странах с холодным климатом. В состав антигололедных реагентов входят химические вещества, которые понижают температуру замерзания воды и затормаживают образование льда. Наиболее часто для этих целей используется NaCl из-за его доступности, низкой стоимости и невысокой токсичности для человека. Однако, в высоких концентрациях он токсичен для

большинства растений и вызывает так называемый солевой стресс, который оказывает влияние на растительные организмы на физиологическом, гистологическом, клеточном и молекулярном уровнях. В частности, он приводит к ограничению поглощения питательных веществ, нарушению ионного баланса деревьев и, в конечном итоге, к гибели придорожной растительности. Тем не менее, системных исследований с привлечением физико-химического и биологического анализа по этой проблеме не проведено. Реакция растений на NaCl детально исследована для растений засушливых регионов и включает изменения ионного, осмотического и электрического баланса растительной клетки. Подобные нарушения приводят к задержке роста и развития всего растительного организма. При высоких уровнях NaCl (>40 мМ) наступает состояние острой токсичности, проявляющееся в повреждении и отмирании клеток, и порой приводящее к гибели растения.

Целью данной работы являлись анализ содержания Na^+ и катионов других щелочноземельных металлов в пробах снега, собранных на разном расстоянии от автомобильных дорог после применения антигололедных обработок в г. Минске и Минском районе (метод пламенной спектрофотометрии), исследование роста и развития модельных видов высших растений в субстратах, изготовленных на основе данных проб (культуры *in vitro*) и исследование влияния NaCl на производство АФК в корнях растений. В качестве модельных объектов выступали *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Forsythia intermedia* Zabel и *Betula pendula* Roth.

Элементный анализ исследуемых проб снега показал высокое содержание Na^+ . Его концентрация во всех пробах многократно превышала уровни K^+ и Ca^{2+} . На самом приближенном к трассе участке (1 м) она составила $365 \text{ мМ} \pm 28 \text{ мМ}$, в середине исследуемого диапазона расстояний (50 м) – $11,9 \pm 2,3 \text{ мМ}$ и на наиболее отдаленном (100 м) – $3,2 \pm 2,1 \text{ мМ}$. На втором месте по содержанию в тестируемых пробах оказался Ca^{2+} (на расстоянии 1 м: $18,7 \pm 1,3 \text{ мМ}$; 50 м: $0,4 \pm 0,1 \text{ мМ}$; 100 м: $0,125 \pm 0,001 \text{ мМ}$). На третьем месте – K^+ , его концентрация в пробе, отобранной на расстоянии 1 м, составляла $1,1 \pm 0,07 \text{ мМ}$, на расстоянии 50 м – $0,04 \pm 0,004 \text{ мМ}$ и на 100 м – $0,005 \pm 0,003 \text{ мМ}$. Известно, что такие низкие уровни Ca^{2+} и K^+ безвредны для высших растений. Соответственно, токсическое действие антигололедных обработок связано с содержанием Na^+ .

Ростовые тесты показали, что наиболее ингибирующее воздействие проб проявлялось в отношении форзиции промежуточной. Пробы, отобранные на расстоянии 1 и 5 м от автотрассы, полностью подавляли рост как побегов, так и корней данного растения, на расстоянии 25 м снижали скорость роста побегов на 43% и на 26% корня, на расстоянии 100 м не подавляли рост (рис. 1, панель а). Береза повислая и арабидопсис были

менее чувствительными к загрязнению, однако демонстрировали полное угнетение роста корней и побегов на фоне проб, отобранных на расстоянии 1 и 5 м от дороги (рис. 1, панель б, в). Рост корней березы повислой ингибировался пробами, отобранными на расстоянии 25 м, на 35%, побегов на 25%; а пробами, отобранными на расстоянии 50 м, рост корней и побегов подавлялся на 32% и 18%, соответственно. У арабидопсиса пробы, отобранные на расстоянии 25 м от дороги, ингибировали рост на 40%, а на 50 м – на 34%. Эти данные коррелировали с эффектом обработки NaCl на тестируемые виды растений.

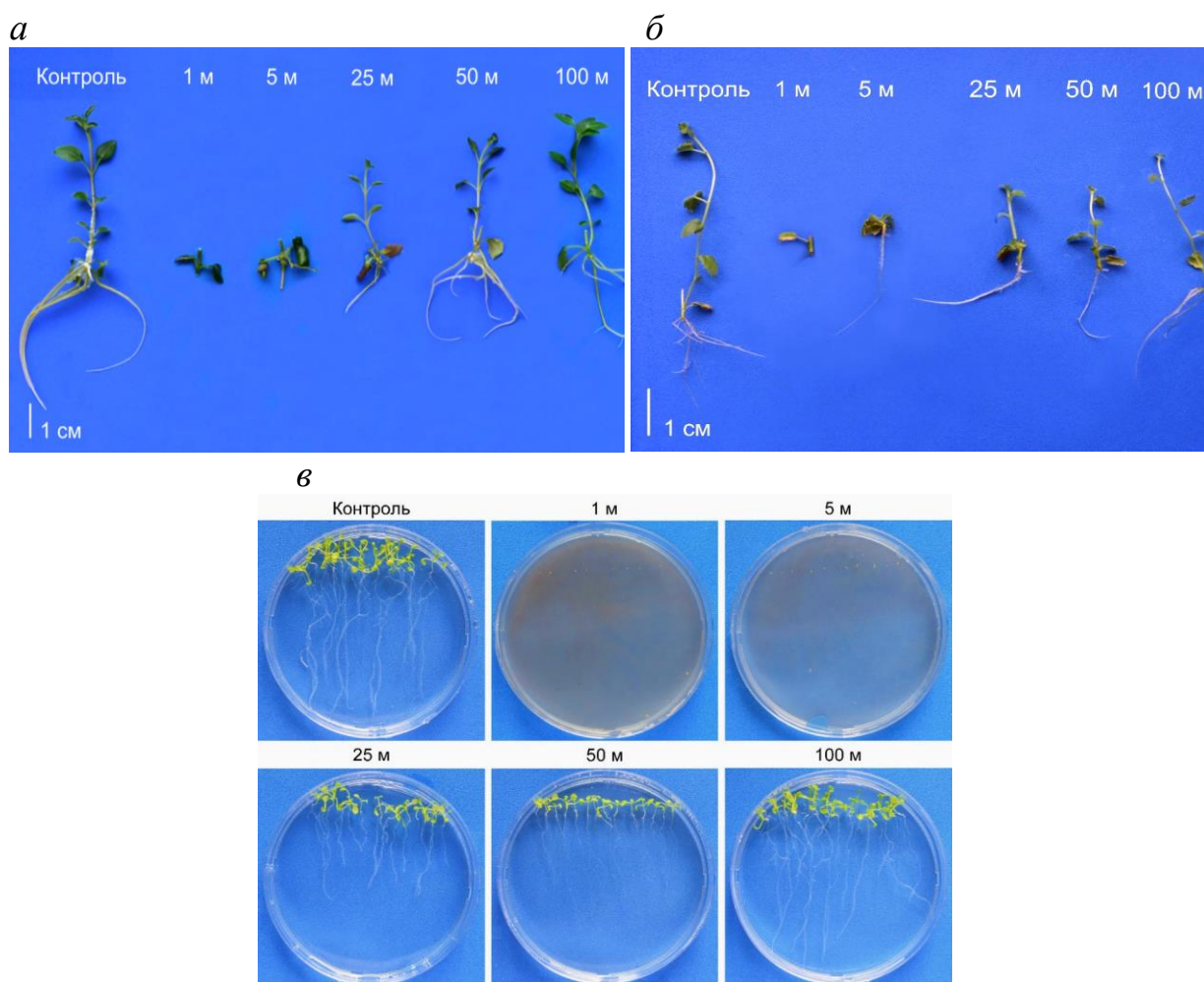


Рис. 1. Влияние антигололедных обработок на внешний вид и ростовые параметры модельных видов высших растений в культуре *in vitro*:
а – *Forsythia intermedia*; б – *Betula pendula*; в – *Arabidopsis thaliana*

Анализ генерации АФК в клетках корней *Arabidopsis thaliana* в ответ на засоление проводился при помощи метода эпифлуоресцентной микроскопии. Семидневные проростки подвергались воздействию 40-200 мМ

NaCl в течение 30-60 мин, после чего корни окрашивались 10 мин в 50 мкмоль/л 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин диацетате (H₂DCFDA), промывались буфером (ммоль/л: 0,1 KCl, 0,1 CaCl₂, 1 Трис / 2 Мес, pH 6,0) и анализировались при помощи микроскопа Nikon Eclipse TS100 (фильтр FITC). Было показано, что интенсивность флуоресценции зонда в клетках корня арабидопсиса возрастала с увеличением концентрации соли. Максимальное увеличение свечения H₂DCFDA (в 2,4 раза по сравнению с контролем) в зоне всасывания вызывала обработка летальной концентрацией NaCl (200 ммоль/л) на протяжении 60 мин, после чего интенсивность флуоресценции снижалась. В кончиках корней достоверное увеличение интенсивности флуоресценции в 1,5 раза было отмечено на 45 мин, после чего интенсивность флуоресценции не изменялась. Совместная обработка 200 ммоль/л NaCl с антиоксидантами уменьшала интенсивность флуоресценции H₂DCFDA, при этом, наибольший протекторный эффект наблюдался при добавлении 1 мМ тиомочевины (интенсивность флуоресценции пробы снижалась на 53% по сравнению с обработкой солью). По-видимому, токсический эффект NaCl был обусловлен повышением уровня АФК, в первую очередь гидроксильных радикалов.

Изучение кинетики образования ковалентных аддуктов при взаимодействии вторичных метаболитов растений с белками пищи и организма человека в пептидной модельной системе

**Алхаже К.^{А*}, Голушко Н. И.^{А,Б}, Билова Т. Е.^{А,Б}, Ерофеева Н. О.^Б,
Соболева А. В.^А, Фролов А. А.^А**

^А *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологии, Москва, Российская Федерация.*

**E-mail: katrina.994.g@gmail.com*

^Б *Санкт-Петербургский государственный университет, Кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербург, Российская Федерация.*

Гликирование белков и образующиеся в ходе этого процесса конечные продукты глубокого гликирования (КПГГ) рассматриваются в качестве ключевых факторов системного воспаления. Известно, что системное субклиническое воспаление лежит в основе возникновения и патогенеза ряда связанных с возрастом хронических расстройств, таких как сахарный диабет, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания. К сожалению, синтетические лекарственные препараты, направленные на снижение вредного воздействия КПГГ на организм человека, обладают ши-

роким спектром нежелательных побочных эффектов. Поэтому, поиск растительных соединений, обладающих антигликирующими свойствами, является особо актуальным.

Известно, что в основе антигликирующего эффекта вторичных метаболитов растений могут лежать различные механизмы, чаще всего так или иначе связанные с их антиоксидантной активностью. Однако растительные КППГ накапливаются в плазме крови вегетарианцев, в то время как растительные соединения быстро метаболизируются и выводятся из организма человека. Это предлагает дополнительный механизм, обуславливающий пролонгированное противовоспалительное действие этих природных соединений. Высокая реактивность растительных вторичных метаболитов в отношении образования ковалентных аддуктов с белками пищи и организма человека может служить важной основой этого эффекта. Образование белковых аддуктов хорошо известно для полифенолов и электрофильных серосодержащих соединений. Однако, несмотря на имеющуюся информацию о механизмах таких ковалентных взаимодействий, конкретные структуры образующихся белковых аддуктов и молекулярные механизмы, лежащие в основе антигликирующих эффектов, остаются в значительной степени неохарактеризованными. В связи с этим цель данной работы была детальное изучение кинетики образования и деградации потенциальных пептидных аддуктов вторичных метаболитов растений, образующихся в реакциях с модельными синтетическими декапептидами, в физиологических условиях и условиях термической обработки пищевых природных продуктов. На первом этапе были поставлены инкубации четырех синтетических декапептидов с последовательностью Ac-AFGSAXASGA-NH₂, содержащих в центральной позиции реактивный аминокислотный остаток (X – цистеин C, лизин K, гистидин H или аргинин R) с 10 репрезентативными вторичными метаболитами (кофейная кислота, феруловая кислота, галловая кислота, *p*-кумаровая кислота, галлат эпигаллокатехин, хлорид цианидина, кверцетин, сульфорафан, аллиллизотиоцианат, диаллилдисульфид) при 37°C в течение (0, 1, 3, 7, 14, 21 дней) и при 95°C в течение (0, 5, 15, 30, 60, 120 мин), имитирующих температуру организма человека и приготовления пищи, соответственно. Был проведен хромато-масс-спектрометрический анализ состава реакционных смесей для выявления образовавшихся потенциальных пептидных аддуктов, которые, после чего, были аннотированы по времени удерживания (t_R) и характеристическому отношению массы к заряду (m/z) по сравнению с контролем в отсутствии растительных метаболитов.

Было показано, что наибольшее количество потенциальных аддуктов образовалось при взаимодействии пептида Ac-AFGSACASGA-NH₂ с метаболитами при двух температурах, а наименьшее количество продуктов

было аннотировано в инкубациях пептида Ac-AFGSAH~~A~~ASGA-NH₂ как при 95°C, так и при 37°C. При этом во всех инкубациях пептида Ac-AFGSAR~~A~~ASGA-NH₂ не было выявлено никаких специфических аддуктов. Также, серосодержащие соединения оказались более реакционноспособными в отношении модельных пептидов, чем полифенолы. Для оценки кинетики формирования потенциальных аддуктов, полученные в ходе УВЭЖХ-МС анализа данные были обработаны в программе MS-DIAL. Это позволило определить временные точки с наибольшей интенсивностью сигнала для всех аннотированных ионных масс. Было выявлено, что сигналы большинства аддуктов достигали наибольшей интенсивности на 21й день при 37°C, а в инкубациях при 95°C через 2 часа (120 мин).

Для подтверждения первичной структуры индивидуальных пептидных аддуктов был проведен тандемный масс-спектрометрический анализ. На основе обработки полученных данных будут предложены пары пептид-метаболит для полупрепаративного получения, очистки, и идентификации точных структур пептидных аддуктов методом ЯМР спектроскопии. Дальше планируется оценка противовоспалительной активности этих аддуктов на оптимизированной в группе клеточной модели ТНР-1, представляющей линию острой моноцитарной лейкемии человека. Таким образом, понимание молекулярных механизмов биологической активности в отношении антигликирующего эффекта природных белковых аддуктов обеспечивает базу для разработки антивозрастных перспективных соединений и улучшения стратегий питания в пищевой и фармацевтической промышленности.

Продукция АФК на генеративных органах покрытосеменных растений при поранении

**Бабушкина К. О.^{А*}, Лунёва О. Г.^В, Брейгина М. А.^А,
Успенская М. С.^В**

^А *Московский государственный университет, Биологический факультет, кафедра физиологии растений, Москва, Россия. *E-mail: pollen-ions@yandex.ru*

^В *Московский государственный университет, Биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, Россия.*

^В *НОЦ ботанический сад МГУ.*

Начальные этапы опыления у покрытосеменных растений характеризуются взаимодействием пыльцы с рыльцем, на котором у ряда растений выделяется экссудат – вязкая жидкость, содержащая углеводы, липиды и низкомолекулярные соединения. Пыльца, попадая на влажное рыльце,

гидратируется в экссудате и прорастает. Известно, что эффективное взаимодействие совместимой пыльцы с рыльцем пестика обеспечивается, в частности, низкомолекулярными сигнальными агентами – активными формами кислорода (АФК), которые были найдены как на сухих, так и на влажных рыльцах дивергентных покрытосеменных. Влияние АФК на эффективность прорастания пыльцы была показана на некоторых модельных объектах, а также на пыльце ряда других покрытосеменных растений. Также было показано влияние АФК на пыльцу ели колючей – представителя голосеменных растений; а в ее опылительных каплях – рецептивных жидкостях голосеменных – обнаружены АФК. В совокупности данные о присутствии активных форм кислорода в рецептивных жидкостях как голосеменных, так и покрытосеменных растений, и о влиянии АФК на прорастание их пыльцы позволяют сделать предположение об универсальности данного регуляторного механизма для всех семенных растений. Однако, АФК могут быть как стимулирующим, так и негативным фактором, так, было показано, что высокие концентрации пероксида водорода подавляют прорастание пыльцы табака, а добавление гидроксил радикала вызывало аномалии пыльцевых трубок лилии.

Известно, что АФК (наряду с Ca^{2+} , АБК, этиленом, жасмоновой кислотой и др.) играют ведущую роль в передаче сигнала в стрессовой ситуации, в частности, при поранении. Ранним ответом на поранение вегетативных тканей является продукция АФК: пероксида водорода (H_2O_2) и супероксид радикала. Совершенно не изучен вопрос об ответе генеративных органов растений на поранение, вызывает ли, в частности, повреждение побега гиперпродукцию АФК на рыльце пестика? Следствием подобного эффекта может быть изменение эффективности прорастания пыльцы на рыльце. В таком случае на прорастание пыльцы влияет стрессовое воздействие, оказанное на вегетативные ткани, и регуляторными агентами вновь выступают АФК.

В данной работе была исследована продукция АФК на влажном рыльце пестиков 3 дивергентных покрытосеменных в норме и при поранении побега, несущего цветок. Для детекции суммарных АФК в экссудате рыльца применялся метод ЭПР (электронного парамагнитного резонанса). Использовался неспецифический спиновый зонд САТ1-Н, вступающий в реакцию со всеми активными формами кислорода. Обнаружение пероксида водорода проводилось колориметрически, методом FOX1: он основан на окислении двухвалентного железа перекисью в присутствии ксиленового оранжевого.

На фертильных пестиках каждого из выбранных объектов (кирказона крупнолистного, барбариса обыкновенного и древовидного пиона)

наблюдалось изменение продукции АФК, вызванное поранением – сломом ветки с цветком либо соцветием на расстоянии 10 см от цветоножки. Содержание АФК в экссудате повышалось через определенный (разный для каждого объекта) промежуток времени, достигало пикового значения и затем постепенно снижалось. Соотношение супероксид радикала и пероксида водорода было похожим для всех объектов: вклад пероксида водорода в суммарный уровень АФК оказывался небольшим.

Полученные нами данные позволяют с уверенностью говорить о реакции генеративных органов растения на поранение его вегетативной части. Возможно, одним из ответов на поранение является изменение эффективности прорастания пыльцы, связанное с гиперпродукцией АФК на рыльце. Это предположение, однако, требует проверки в ходе дальнейших исследований.

Супероксиддисмутаза премодулирует окислительный стресс в пластидах для защиты растений табака от повреждения

Баранова Е. Н.^{А,Б,В*}

^А *Институт стратегии развития, Москва, Россия*

^Б *Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия,*

^В *Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия К.А. Тимирязевская (РГАУ-МСХА), Москва, Россия. *E-mail: greenpro2007@rambler.ru*

АФК-зависимая индукция окислительного повреждения может быть использована в качестве триггера, инициирующего генетически детерминированную неспецифическую защиту в клетках и тканях растений. Растения потенциально способны противостоять различным специфическим (токсическим, осмотическим) факторам абиотического воздействия, но не обладают достаточной или специфической чувствительностью для формирования адекватного эффективного ответа. В данной работе мы демонстрируем один из возможных подходов успешной холодной акклиматизации за счет формирования эффективной защиты фотосинтетических структур благодаря внедрению в геном табака гетерологичного гена FeSOD под контролем конститутивного промотора и снабженного сигнальной последовательностью, обеспечивающей таргетинг белка в пластиду. Повышенная ферментативная активность супероксиддисмутазы в пластидном компартменте трансгенных растений табака позволяет снижать вредные последствия от окислительного фактора стрессов окружающей среды, нейтрализуя негативное действие АФК. С другой стороны, такая устойчивость создает проблемы, и при выращивании в нормальных

условиях нарушает расположение внутри хлоропластных субдоменов, что приводит к модификации стромальных тилакоидов, и вероятно, существенно влияет на процессы фотосинтеза, регулирующие эффективность фотосистемы II. Частично это компенсируется тем, что одновременно в нормальных условиях продукция пероксида индуцирует активацию ферментов детоксикации АФК. Однако нарушение ряда процессов, таких как накопление, утилизация и транспорт сахаров и крахмала, приводит к сдвигу метаболических цепочек. Ожидаемым шагом дальнейшего совершенствования применяемой технологии могло бы стать как использование индуцибельных промоторов в кассете экспрессии, так и добавление в генетическую конструкцию других генов, кодирующих ферменты, нейтрализующие перекись водорода, которые находятся ниже по метаболической цепи. Сверхэкспрессия различных генов супероксиддисмутаз оказалась очень интересной и многообещающей стратегией для защиты от биотических и абиотических стрессов [1-3]. За счет индукции перекиси активируются другие ферменты антиоксидантной защиты, что приводит к повышению устойчивости и снижению потерь продуктивности при неблагоприятных стрессовых условиях, таких как соль, засуха или холод. Супероксиддисмутазы (СОД) играют ведущую роль в регуляции абиотического стресса, вызывающего окислительный стресс у растений [4]. Исследования в этой области можно разделить на два принципиально различных, хотя и одинаково обоснованных подхода. Первый подход – это концепция спасения клеток от повреждений, вызванных активными формами кислорода, путем формирования прямой защиты за счет снижения количества АФК в отдельном компартменте, клетке или ткани. Для этого были использованы генетические конструкции с широким набором генов, кодирующих эффективные ферменты, так или иначе используемые клетками для нейтрализации АФК. Исследователи попытались получить трансгенные растения для снижения АФК за счет гетерологичной экспрессии генов каталазы, аскорбатпероксидазы, дегидроаскорбатредуктазы, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы. Эти ферменты значительно снижают риск окислительного повреждения, превращая АФК из окислителей в нейтральные соединения, в частности воду. Это улучшало толерантность растительных клеток и тканей к различным неблагоприятным условиям внешней среды. Несколько в стороне, но близко к этой концепции косвенного снижения окислительного повреждения, была идея использования всевозможных шаперонов, белков LEA или осмотически активных веществ для предотвращения окислительного повреждения за счет снижения способности АФК повреждать мембраны и белки.

Известно, что генерация $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$ а H_2O_2 встречается в разных органах клетки, что подтверждается локализацией соответствующих ферментов.

Разделение производства АФК в растительной клетке определяет биологическую функцию АФК по поддержанию баланса. Локальные колебания концентрации АФК и их накопление зависят от состава, наличия и активности антиоксидантных систем. Основными клеточными органеллами, в которых образуются АФК, являются хлоропласты, митохондрии, пероксисомы и апопласта. Производство АФК в хлоропластах очень тесно связано со светозависимыми реакциями фотосинтеза.

Материалы и методы. В исследовании использовали трансгенные и нетрансгенные растения *Nicotiana tabacum* L сорта Самсун. В качестве контроля использовали нетрансгенные растения дикого типа (WT). Трансгенные растения были получены ранее. Их трансформировали геном Fe-содержащей супероксиддисмутазы (FeSOD) *Arabidopsis thaliana* L. под контролем стандартного промотора CaMV 35S. Синтезируемый фермент направляется в пластиду за счет слитой сигнальной последовательности гена рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы гороха.

Размноженные FeSOD-трансгенные и контрольные растения табака WT высаживали в контейнеры, наполненные перлитом и жидкой питательной средой на $\frac{1}{2}$ МС, и адаптировали к жидкой культуре на 2 недели. Растения выращивали в контролируемых условиях при освещенности $100 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, температуре 24°C и влажности воздуха 60–70 % в ростовой камере KBW-240 («Binder», Германия). Для экспериментов были отобраны однородные растения в фазе вегетативного роста в возрасте 14 дней, имеющие развитую корневую систему и 5 полностью сформировавшихся листьев. Затем растения подверглись стрессу. Холодовой стресс моделировался путем выдержки при температуре 8°C в течение 7 дней в камере выращивания. Контейнеры были возвращены в оптимальные условия (24°C) после воздействия холода. Такой режим холодового воздействия (8°C) был применен в связи с необходимостью сохранения функциональной активности фотосинтетического аппарата изучаемых растений и тем, что такая температура не приводит к гибели растений табака. После завершения эксперимента растения фотографировали и сканировали; материал собирали для биохимических исследований, фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C . Для электронной и световой микроскопии использовали стандартные методы прижизненного обнаружения АФК и фиксации глутарового альдегида с небольшими модификациями, описанными ниже.

Проводили прижизненное фенотипирование растений табака для определения расчетных количественных показателей по окраске листьев. Показатели рассчитывали на основе средних значений, полученных при сканировании растений на основе анализа RGB-изображений. Для получения изображений использовали Феносканер Синерготрон ИСП02-01

(ИСП, Москва, Россия). Для оценки состояния растений рассчитывали индексы на основе предложенных ранее. Для расчета использовали следующие индексы: VARY – алгоритмы дистанционной оценки доли растительности; EXG – цветовые показатели условий освещенности для идентификации растений; GLI — документирование воздействия [5]. Также антиоксидантная активность ферментов исследования активности антиоксидантных ферментов проводили в гомогенатах и ферментных экстрактах из листьев контрольных и трансгенных растений в норме, под действием низкой положительной температуры и через сутки после снятия стрессовых воздействий.

Просвечивающая электронная микроскопия. Фрагменты центральной части листовой пластинки фиксировали для электронно-микроскопического анализа. Нарезанные кусочки объемом 1 мм³ погружали в охлажденный 0,1 М фосфатный буфер, затем фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 с добавкой сахарозы 0,15 мг/мл в течение 4-8 часов в холодильнике при 4° С. После этой процедуры образцы промывали 0,1 М буфером Соренсена и фиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия (OsO₄) в течение 2 часов при температуре 4 °С. Материал обезживали в растворах этанола возрастающей концентрации при температуре 4°С. Затем образцы переносили на пропиленоксид. Смесь эпона и аралдита и пропиленоксида использовали в следующих концентрациях: 1/5; 2/3; 1/1; 3/2; 5/1 (40 минут). Материал переносили в плоские пластиковые формы, содержащие смолу с катализатором. Полимеризацию проводили 24 часа при 45°С, а затем 24 часа при 56°С. Ультратонкие срезы монтировались на медные сетки с формваровой подложкой. Далее срезы контрастировали 1% уранилацетатом (30 минут), затем промывали и контрастировали раствором цитрата свинца (15 минут) и тщательно промывали дистиллированной водой. После высушивания препараты анализировали в электронном трансмиссионном микроскопе Hitachi H-500 (Hitachi, Япония) при рабочем увеличении x10000. Полученные изображения были отсканированы в EpsonPerfection 3170. Для обработки изображений использовали программу MicrosoftPhotoEditor.

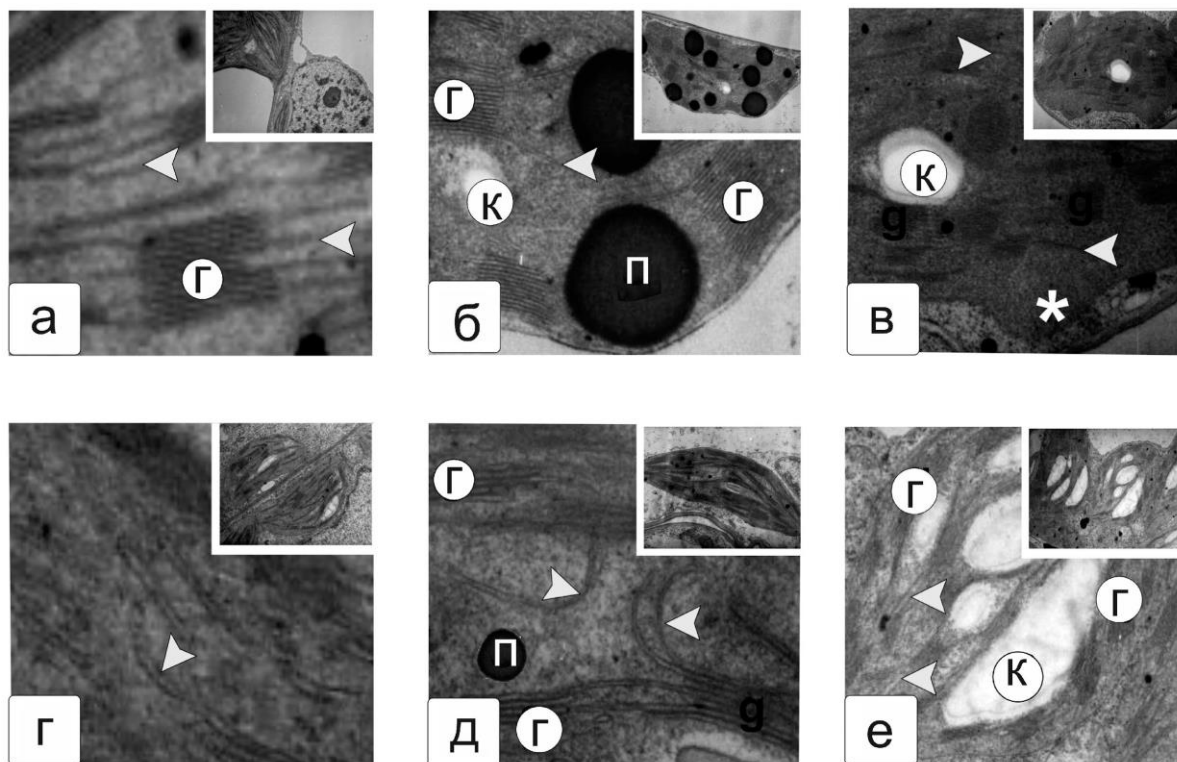


Рис 1. Фрагменты пластид ультраструктуры хлоропластов клеток мезофилла в листьях табака WT (а–в) и FeSOD-трансгенных (г–е) растений в норме (а,г), через 7 дней после низкотемпературного воздействия при + 8 °С (б, д) и через день после восстановления после снятия стресса (в, е). Условные обозначения: п – пластоглобула; г — грана; к – крахмальное зерно; стрелка — стромальные тилакоиды (ламеллы); звездочка — остаточные выпячивания наружной мембраны хлоропластов, заполненные стромой

Окислительный стресс, вызываемый активными формами кислорода, представляет собой общебиологическую высокочувствительную систему восприятия и преодоления большого количества негативных абиотических факторов, ограничивающих эффективную продуктивность сельскохозяйственных культур. АФК-зависимая индукция окислительного повреждения может быть использована в качестве эффективного триггера, инициирующего неспецифическую защиту в клетках и тканях растений [6]. Растения зачастую потенциально способны противостоять различным специфическим (токсическим, осмотическим) факторам абиотического стресса, но теряют тонкую настройку, достаточную для формирования адекватного эффективного ответа. В данной работе мы подтверждаем, что один из возможных подходов к формированию эффективной защиты фотосинтетических структур за счет внедрения чужеродного гена FeSOD *Arabidopsis thaliana* в геном табака под контролем конститутивного промотора и оснащенного сигнальной последовательностью, нацеливающей белок в пластиду, может эффективно премодулировать содержание АФК,

улучшая адаптируемость. Повышенная ферментативная активность супероксиддисмутазы в растительных пластидах трансгенных клеток табака позволяет переносить окислительный фактор стрессов окружающей среды, уничтожая АФК за счет активации защитных программ. Увеличение пула перекиси водорода предотвращает значительные повреждения ультраструктуры клеток, а также способствует более легкому восстановлению после снятия стресса. Очевидно, это не может не влиять на обмен веществ и при выращивании в нормальных условиях несколько нарушает расположение внутривуллопластных субдоменов. Это приводит к модификации стромальных тилакоидов, вероятно, значительно изменяя фотосинтетические процессы, которые регулируют эффективность Фотосистемы II. Частично это компенсируется тем, что одновременно в нормальных условиях продукция перекиси водорода индуцирует активацию ферментов детоксикации АФК. Предположительно, существенно нарушается ряд процессов, таких как метаболизм накопления, утилизации и транспорта сахаров и крахмала, что приводит к сдвигу метаболических цепочек. Ожидаемым шагом дальнейшего совершенствования используемой технологии является как использование индуцибельных промоторов в каскаде экспрессии, так и добавление к генетической конструкции других генов, кодирующих ферменты, захватывающие перекись водорода, расположенные ниже по метаболической цепи, что было сделано в ряде исследований.

Библиографические ссылки

1. Gill, S.S.; Anjum, N.A.; Gill, R.; Yadav, S.; Hasanuzzaman, M.; Fujita, M.; Mishra, P.; Sabat, S.C.; Tuteja, N. Superoxide dismutase—Mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015, 22, 10375–10394.
2. Gulevich, A.A.; Kurenina, L.V.; Baranova, E.N. Application of a system for targeting Fe-dependent superoxide dismutase and choline oxidase enzymes to chloroplast as a strategy for effective plant resistance to abiotic stresses. *Russ. Agr. Sci.* 2018, 44, 118–123.
3. Baranova, E.N.; Kurenina, L.V.; Smirnov, A.N.; Beloshapkina, O.O.; Gulevich, A.A. Formation of the hypersensitivity response due to the expression of FeSOD1 gene in tomato when it is inoculated with *Phytophthora infestans*. *Russ. Agr. Sci.* 2017, 43, 15–21.
4. Myouga, F.; Hosoda, C.; Umezawa, T.; Lizumi, H.; Kuromori, T.; Motohashi, R.; Shono, Y.; Nagata, N.; Ikeuchi, M.; Shinozaki, K. A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development. *Plant Cell* 2008, 20, 3148–3162.
5. Baranova, E. N., Kononenko, N. V., Lapshin, P. V., Nechaeva, T. L., Khaliluev, M. R., Zagorskina, N. V., Smirnova E.A., Yuorieva N.O., Raldugina G.N., Chaban I.A., Kurenina L.V., Gulevich, A. A. (2024). Superoxide Dismutase Premodulates Oxidative Stress in Plastids for Protection of Tobacco Plants from Cold Damage Ultrastructure Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5544

6. Schmitt, F.-J.; Kreslavski, V.D.; Zharmukhamedov, S.K.; Friedrich, T.; Renger, G.; Los, D.A.; Kuznetsov, V.V.; Allakhverdiev, S.I. The multiple roles of various reactive oxygen species (ROS) in photosynthetic organisms. In *Photosynthesis: A New Approach to the Molecular, Cellular, and Organismal Levels*; Allakhverdiev, S.I., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 4–82.

Разработка праймеров для молекулярно-генетического анализа ДНК-маркеров *DHN1* и *DHN2 Beta vulgaris* L.

Бахметова А. Ф.^{А*}, Можаровская Л. В.^Б

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: bahmetovaarina@gmail.com

^Б Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь.

Растения, как организмы, ведущие прикрепленный образ жизни, в большей степени подвержены действию абиотических стресс-факторов (засуха, засоление почв, гипо- и гипертермия, загрязнение атмосферного воздуха и т.п.), что приводит к накоплению в растительных клетках активных форм кислорода (АФК). АФК участвуют во многих физиологических процессах регуляции роста и развития растений, однако их избыточное накопление вызывает повреждение и нарушение работы практически всех клеточных структур [1]. Специфическим защитным механизмом от накопления АФК для растений является повышение функциональной активности комплекса белков дегидринов, выступающих в качестве антиоксидантов [2]. Антиоксидантная активность дегидринов связана с их способностью к непосредственной нейтрализации свободных радикалов, образующихся в результате стрессовых воздействий, и с их способностью к образованию хелатных комплексов с ионами тяжелых металлов, которые в свою очередь являются индукторами АФК [1,3].

Объектом данного исследования являлись растения ценной сельскохозяйственной культуры – *Beta vulgaris* L. С использованием баз данных WGS и EST GeneBank NCBI *B. vulgaris* осуществлялся поиск и идентификация генов-кандидатов, кодирующих белки дегидрины. К отобранным генам *DHN1* (*COR410*) и *DHN2* (*Rab18*) были сконструированы специфичные олигонуклеотидные праймеры (прямой и обратный) с помощью онлайн-ресурса Primer BLAST NCBI. Проверка специфичности работы праймеров проводилась на основе ПЦР-анализа с последующим электрофоретическим фракционированием продуктов амплификации.

При идентификации ДНК-локусов генов *DHN1* (*COR410*) и *DHN2* (*Rab18*) с помощью онлайн-ресурса Conserved domains NCBI была пока-

зана принадлежность продуктов данных генов к семейству белков дегидринов, идентифицирован структурно-функциональный домен Dehydrin (CDD ID: pfam00257). Для конструирования праймеров (таблица 1) использовались проаннотированные последовательности соответствующих генов *DHN1* и *DHN2* базы данных GeneBank NCBI.

Таблица 1

Характеристика сконструированных праймеров для ДНК-маркеров генов, кодирующих дегидрины

ДНК-маркер	Последовательность праймеров	Длина, п.н.	Температура, °C	ГЦ-состав, %	Продукт, п.н.
<i>DHN1</i>	F: 5'-TAGCTCATCAGAGGAAGAGGTG-3'	22	58,70	50,00	244
	R: 5'- ATTCCCGGGCAATTTCTCCAA-3'	21	60,27	47,62	
<i>DHN2</i>	F: 5'-TGAGTATGGAACCCAGTTCGT-3'	22	59,36	45,45	210
	R: 5'- ACACCTGTGTCATAGCTGCC-3'	20	60,04	55,00	

При отборе наиболее подходящих и качественных праймеров учитывался тот факт, что разница в температуре отжига прямого (F) и обратного (R) праймеров должна быть минимальна, поскольку это позволяет исключить вероятность неспецифического отжига. Для того чтобы оценить пригодность полученных праймеров для каждого из двух ДНК-маркеров генов *DHN1* и *DHN2* использовался онлайн-ресурс UNAFold. При помощи данного ресурса проверялась температура, при которой каждый из отобранных праймеров будет формировать вторичные структуры при отжиге. Дополнительно была проведена проверка, на определение температуры, при которой праймеры будут гибридизоваться друг с другом. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Температуры неспецифического отжига, влияющие на образование вторичных структур и гибридизацию сконструированных праймеров

Праймер	Температура, при которой происходит образование вторичных структур, °C	Температура, при которой происходит гибридизация праймеров, °C
DHN1 - F	44,9	7,7
DHN1 - R	26,0	
DHN2 - F	33,2	0,1
DHN2 - R	37,7	

Как следует из таблицы 2, установлено, что полученные праймеры пригодны для использования: образование вторичных структур не происходит и их гибридизация при отжиге не наблюдается, поскольку отображенные температуры меньше рекомендованных температур отжига. В

ходе апробации праймеров к ДНК-локусам генов, кодирующих белки дегидрины, была продемонстрирована их высокая специфичность, поскольку полученные ПЦР продукты при постановке горизонтального гель-электрофореза имели ожидаемую массу по отношению к стандартному ДНК маркеру молекулярного веса 100 bp (Праймтех, Беларусь).

Дегидрины представляют собой семейство мультифункциональных протекторов, способных защищать растение от множества абиотических стрессоров, не только подавляя активность АФК, но и предотвращая их образование в растительных клетках. Разработанные праймеры для ДНК-маркеров *DHN1* и *DHN2* в дальнейшем могут быть использованы для изучения изменения активности экспрессии генов, кодирующих дегидрины, при действии стресс-факторов, что позволит селекционерам создавать и отбирать наиболее устойчивые к неблагоприятным условиям среды генотипы *B. vulgaris*.

Библиографические ссылки

1. Вклад дегидринов в антиоксидантную защиту растений / Ч.Р. Аллагулова, Ф.М. Шакирова // Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений. Роль активных форм кислорода в жизни растений: Материалы II Международного симпозиума и международной научной школы, Уфа, 26 июня – 01 июля 2017 года / Редактор И.В. Максимов [и др.] – Уфа: ООО «Первая типография», 2017. – С. 48-51.

2. Дегидрины растений / Боровский Г.Б., Коротаева Н.Е., Уколова И.В. // ББК 28.58 Ф18. – 2016. – С. 16-18.

3. Перспективы генетической трансформации древесных растений генами дегидринов с целью очистки почв от тяжёлых металлов / Скороходова К.В. [и др.] // Биоразнообразие, состояние и динамика природных и антропогенных экосистем России. – 2021. – С. 293-297.

Изменения в антиоксидантной системе корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtXTH1* в условиях кадмиевого стресса

Бережнева З. А.^{А*}, Мусин Х. Г.^А, Кулуев Б. Р.^А

^А Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, лаборатория геномики растений, Уфа, Россия. *E-mail: berezhneva-z@yandex.ru

Ксилоглюканэндотрансгликозилазы (XTHs) являются апопластическими гидролитическими ферментами, осуществляющими реакции трансгликозилирования и расщепления связующих гликанов (ксилоглюканов), что способствует разрыхлению клеточной стенки корневой системы растений, что необходимо для роста клеток, особенно в условиях дефицита

влаги [1]. Абиотические стресс-факторы, такие как засоление, гипотермия и тяжелые металлы негативно влияют на растения из-за увеличения уровня окислительного стресса, образования активных форм кислорода (АФК) в клетках, которые могут разрушать структуру и компоненты растительной клетки. Белковые продукты генов *XTHs* выполняют важную роль в обеспечении роста растений при воздействии абиотических стресс-факторов, а также оказывают положительный эффект на устойчивость растений в данных условиях [2]. Однако молекулярные механизмы защитного эффекта *XTHs* на растения остаются малоизученной. Ген *PtrXTH1* кодирует одну из ксилотрансглюканэндотрансгликозилаз *Populus tremula* L., продукт которого участвует в адаптации растений к абиотическим стресс-факторам, таким как засуха и засоление [3].

Целью исследования являлась оценка состояния компонентов антиоксидантной системы корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* в условиях кадмиевого стресса. Трансгенные растения табака с геном *PtrXTH1* были получены ранее в нашей лаборатории. В настоящем исследовании трансгенные растения проращивались в камерах роста Binder при температуре 25 °C, освещенности 140 мкмоль/(м²с) и фотопериоде 16/8 часов на среде Мурасиге-Скуга. После 10 дней проращивания на питательной среде с антибиотиком гигромицином проростки с одинаковыми размерами корней переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС при нормальных условиях и с добавлением 200 мкМ ацетата кадмия. Через 10 дней эксперимента был проведен анализ компонентов антиоксидантной системы корней и определено содержание общего растворимого белка.

По результатам оценки содержания общего растворимого белка (рис. 1а) выявлено, что в корнях трансгенных растений происходит большее его накопление при действии кадмиевого стресса, чем у дикого типа. В корнях трансгенных растений обнаружена повышенная по сравнению с диким типом общая антиоксидантная способность (рис. 1б), как при нормальных условиях, так и при воздействии кадмия. Активность супероксиддисмутазы (рис. 1в) была меньше у трансгенных растений по сравнению с диким типом, как при нормальных условиях, так и при действии стресса. При нормальных условиях каталазная активность (рис. 1г) была выше у трансгенных растений по сравнению с диким типом, а при стрессе существенно не отличалась. Активность аскорбатпероксидаз (рис. 1д) была больше в трансгенных растениях как при нормальных условиях, так и при кадмиевом стрессе по сравнению с диким типом. Активность гваяколпероксидазы (рис. 1е) как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов в корнях трансгенных растений находилась на уровне дикого типа.

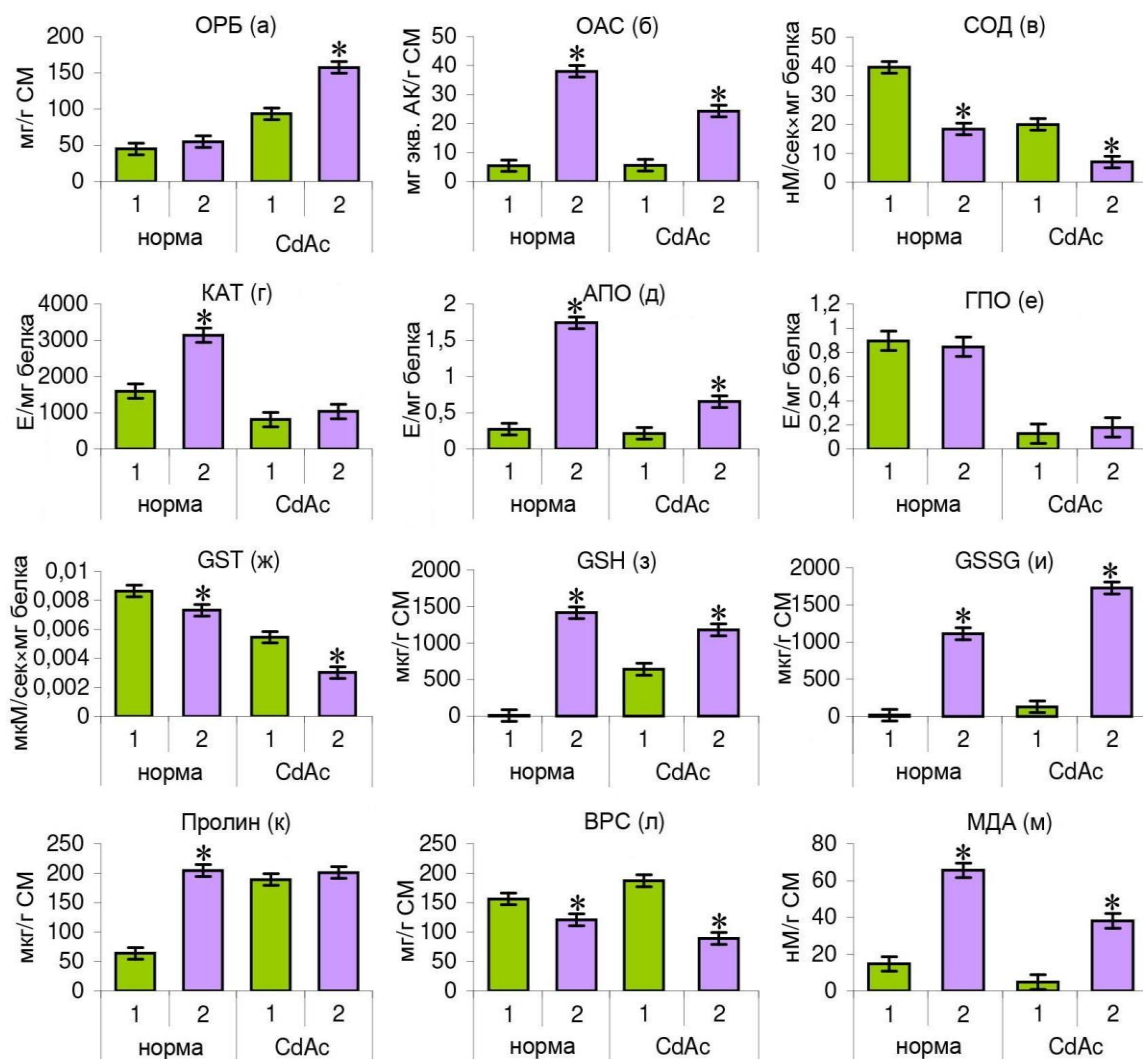


Рис. 1. Анализ компонентов антиоксидантной системы в корнях табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* при нормальных условиях и при воздействии кадмиевого стресса (200 мкМ CdAc) через 10 дней после начала опыта на вертикально-ориентированных чашках Петри: а – содержание общего растворимого белка; б – общая антиоксидантная способность; в – активность супероксиддисмутазы; г – активность каталазы; д – активность аскорбатпероксидазы; е – активность гваяколпероксидазы; ж – активность глутатион-S-трансферазы; з – содержание восстановленного глутатиона; и – содержание окисленного глутатиона; к – содержание пролина; л – содержание водорастворимых сахаров; м – содержание малонового диальдегида. 1 – дикий тип, 2 – трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1*

Примечание: СМ – сырая масса. n=15. Норма – нормальные условия, CdAc – добавление 200 мкМ ацетата кадмия. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$)

Активность глутатион-S-трансферазы (рис. 1ж) в трансгенных растениях табака при нормальных условиях и при влиянии стресса в корнях трансгенных растений была существенно ниже, чем у дикого типа. При

нормальных условиях и при действии ацетата кадмия содержание восстановленного (рис. 1з) и окисленного (рис. 1и) глутатиона в корнях трансгенных растениях было намного выше, чем у дикого типа. Содержание пролина (рис. 1к) было выше в трансгенных растениях со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* при нормальных условиях по сравнению с диким типом. При действии ацетата кадмия содержание пролина в корнях трансгенных растений существенно не отличалось от содержания пролина в корнях дикого типа. При нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса содержание водорастворимых сахаров (рис. 1л) в трансгенных растениях табака было меньше по сравнению с диким типом. Содержание малонового диальдегида (рис. 1м) при нормальных условиях было в 4 раза больше в корнях трансгенных растений табака по сравнению с диким типом. При воздействии кадмия содержание малонового диальдегида в трансгенных растениях становится меньше, чем при нормальных условиях, но оставалось высоким по сравнению с диким типом при тех же стрессовых условиях.

Сверхэкспрессия гена *PtrXTH1* при действии кадмиевого стресса способствовала увеличению в корнях общей антиоксидантной способности, активности аскорбатпероксидазы, содержания окисленного и восстановленного глутатиона. Трансген *PtrXTH1* оказывал положительное влияние на активность компонентов антиоксидантной системы в корнях растений табака *Nicotiana tabacum* L. при нормальных условиях и действии кадмия. Ген *PtrXTH1* может быть рекомендован для создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к тяжелым металлам.

Библиографические ссылки

1. Van Sandt V.S., Suslov D., Verbelen J.P., Vissenberg K. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall // *Annals of Botany* 100. 2007. PP. 1467-1473.
2. Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в условиях кадмиевого стресса // *Физиология растений*. 2022. Т. 69. № 5. С. 522-530.
3. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Участие генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз *PtrXTH1* и *PnXTH1* в регуляции роста и адаптации растений к стресс-факторам // *Физиология растений*. – 2018, Т. 65, № 1. – С. 34-45.

Баланс активных форм кислорода на влажных рыльцах однодольных и двудольных растений

Брейгина М. А.^{А*}, Бабушкина К. О.^А, Лунёва О. Г.^Б

^А Московский государственный университет, Биологический факультет, кафедра физиологии растений, Москва, Россия. *E-mail: pollen-ions@yandex.ru

^Б Московский государственный университет, Биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, Россия.

Эффективное взаимодействие между мужским гаплоидным поколением – пыльцой - и рыльцем пестика, приводящее к стимуляции прорастания совместимой пыльцы – одно из ключевых условий образования семян у цветковых растений. Возможность такого взаимодействия – важное эволюционное приобретение, которое обеспечило покрытосеменным растениям репродуктивный успех. Из низкомолекулярных сигнальных агентов наиболее универсальными считаются активные формы кислорода (АФК), которые, как было показано для ряда цветковых растений, продуцируются женскими тканями перед опылением (McInnis *et al.* 2006; Zafra *et al.* 2016) и могут восприниматься пыльцой как сигнал. Для некоторых наиболее изученных видов, таких как лилия и табак, было показано, что АФК влияют на эффективность прорастания пыльцы и скорость роста пыльцевой трубки, а также ионный гомеостаз. Чувствительными к экзогенным АФК оказались ионные токи и мембранный потенциал вегетативной клетки пыльцевого зерна табака и лилии (Максимов *et al.* 2015; Breygina *et al.* 2016; Podolyan *et al.* 2019). Однако, данные о продукции АФК на рыльцах были весьма ограниченными в связи с отсутствием методических подходов: ранее исследования проводили методом окрашивания рыльца, что не позволяло дифференцировать различные АФК и количественно их оценивать.

У покрытосеменных растений с влажным рыльцем пыльца выходит из состояния физиологического покоя и прорастает в вязкой жидкости, которую называют рыльцевым экссудатом, и которая содержит неорганические ионы, углеводы, белки и жирные кислоты. Сбор экссудата и анализ содержания в нем АФК с помощью высокоточных методов, а также воздействие на редокс-гомеостаз рыльца в интактных цветках позволили нам изучить различные аспекты продукции, взаимопревращения и накопления АФК, а также значение этих процессов для прорастания пыльцы *in vivo*.

Исследование проводилось в двух направлениях: (1) видовой скрининг, в рамках которого изучалась продукция АФК на рыльцах представителей различных отдаленных в систематическом отношении семейств;

и (2) углубленное исследование взаимопревращения АФК на рыльце с помощью модельных растений – представителей однодольных и двудольных растений.

В ходе исследования применялся метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Он основан на способности парамагнитного вещества, помещенного в постоянное магнитное поле, резонансно поглощать электромагнитное излучение (Haywood 2013; Menezes *et al.* 2024). Для обнаружения АФК и оценки их количества в среде используют спиновые ловушки и спиновые зонды: первые реагируют со свободными радикалами и образуют аддукты, обладающие уникальными ЭПР-спектрами; вторые окисляются практически любыми АФК, образуя неспецифические аддукты, однако эти соединения более стабильны и обладают высокой чувствительностью.

В видовом скрининге на данный момент участвовали представители следующих семейств: Кирказоновые, Бромелиевые, Орхидные, Лилейные, Спаржевые, Пионовые, Барбарисовые, Пасленовые, Геснериевые. Скрининг проводился по следующему плану: оптимизация метода сбора интактного свежего экссудата рыльца, измерение суммарного уровня АФК с помощью ЭПР спектроскопии и неспецифического спинового зонда САТ-1Н (Dikalov *et al.* 2018), измерение концентрации пероксида водорода колориметрическим методом FOX-1, измерение уровня генерации супероксид радикала методом ЭПР спектроскопии с помощью специфичной спиновой ловушки DEPMPO (для представителей ряда семейств) (Zhu 2016), изучение влияния выявленных в экссудате АФК на прорастание пыльцевых зёрен *in vitro*. Полученные данные вошли в ряд публикаций (Breygina *et al.* 2022, 2023), однако значительная часть данных получена недавно и будет представлена впервые.

Суммарные АФК были обнаружены в рецептивных жидкостях всех видов, однако их количество, а также соотношение между супероксид-радикалом и пероксидом водорода различались у представителей разных систематических групп. Так, для представителей семейства Орхидных был характерен низкий уровень АФК, а для представителей Бромелиевых – высокий, причем у первых преобладал пероксид водорода, а у вторых – супероксид радикал. Значимость той или иной АФК в качестве регуляторного фактора для пыльцы соответствующих видов была проверена в системе *in vitro* и также сильно различалась у представителей разных таксонов.

Полученные данные демонстрируют как универсальность роли АФК в качестве регуляторных агентов в репродуктивных взаимодействиях у цветковых растений, так и разнообразие паттернов их генерации. Мы установили, что одна из двух АФК всегда преобладает в экссудате рыльца,

она же, как правило, оказывает на пыльцу более значимый эффект и, по-видимому, является «ведущей» в регуляторных процессах. Для представителей разных систематических групп это может быть как супероксид-радикал, так и пероксид водорода.

Библиографические ссылки

1. Breygina MA, Abramochkin DV, Maksimov NM, Yermakov IP (2016) Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts. *Plant Biology* 18, 761–767. doi:10.1111/plb.12470.

2. Breygina M, Luneva O, Schekaleva O, Lazareva N, Babushkina K, Kirilyuk IA (2023) Pattern of ROS generation and interconversion on wet stigmas in basal and divergent angiosperms. *Plant Growth Regulation*. doi:10.1007/s10725-023-01033-w.

3. Breygina M, Schekaleva O, Klimenko E, Luneva O (2022) The balance between different ROS on tobacco stigma during flowering and its role in pollen germination. *Plants* 11, 993.

Dikalov SI, Polienko YF, Kirilyuk I (2018) Electron Paramagnetic Resonance Measurements of Reactive Oxygen Species by Cyclic Hydroxylamine Spin Probes. *Antioxidants and Redox Signaling* 28, 1433–1443. doi:10.1089/ars.2017.7396.

Haywood R (2013) Spin-Trapping: Theory and Applications. ‘Encycl. Biophys.’ pp. 2447–2453. (Springer Berlin Heidelberg) doi:10.1007/978-3-642-16712-6_579.

McInnis SM, Desikan R, Hancock JT, Hiscock SJ (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: Potential signalling crosstalk? *New Phytologist* 172, 221–228. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01875.x.

Menezes FAF, Oliveira JG, Guimarães AO (2024) Electron Paramagnetic Resonance Applied to Free Radicals and Reactive Oxygen Species Detection in Plant Systems. *Applied Magnetic Resonance* 55, 335–355. doi:10.1007/S00723-023-01625-9.

Podolyan A, Maksimov N, Breygina M (2019) Redox-regulation of ion homeostasis in growing lily pollen tubes. *Journal of Plant Physiology* 243, 153050. doi:https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153050.

Zafra A, Rejón JD, Hiscock SJ, Alché JDD (2016) Patterns of ROS accumulation in the stigmas of angiosperms and visions into their multi-functionality in plant reproduction. *Frontiers in Plant Science* 7, 1112–1119. doi:10.3389/fpls.2016.01112.

Zhu H (2016) Assays for Detecting Biological Superoxide. *Reactive Oxygen Species* 1, 65–80. doi:10.20455/ros.2016.813.

Максимов Н, Брейгина М, Ермаков И (2015) Регуляция ионного транспорта на плазмалемме пыльцевых трубок пероксидом водорода. *Цитология* 57, 720–726.

Участие ферментативной и неферментативной антиоксидантных систем в стрессовом ответе лишайника *Peltigera canina* на действие повышенной температуры

**Валитова Ю. Н.^{А*}, Хабибрахманова В. Р.^А, Гурьянов О. П.^А,
Уваева В. Л.^А, Хайруллина А. Ф.^А, Рахматуллина Д. Ф.^А,
Галеева Е. И.^А, Трифонова Т. В.^А, Викторова Л. В.^А,
Минибаева Ф. В.^А**

^А Казанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра Казанского научного центра РАН, г. Казань, Россия.

*E-mail: yulavalitova@mail.ru

Растения-экстремофилы вызывают живой интерес исследователей уже в течение многих лет. К ним относятся и лишайники, представляющие собой симбиотические ассоциации между грибами (микобионтами) и водорослями и/или цианобактериями (фотобионтами). Температурный стресс является достаточно обычным явлением для лишайников, произрастающих в неблагоприятных условиях, причем в высушенном состоянии большинство лишайников чрезвычайно устойчивы к повышенной температуре, тогда как гидратированные талломы обладают значительно большей чувствительностью [1]. Пельтигеровые лишайники обитают в умеренном климате, и можно предположить, что они обладают повышенной чувствительностью к перепадам температур. К тому же, для них характерны высокие темпы роста и индексы метаболической активности. Одним из известных представителей пельтигеровых является эпигейный двухкомпонентный цианолишайник *Peltigera canina*, который был выбран в качестве объекта исследований.

Известно, что важной составляющей стрессового ответа живого организма на воздействие абиотических стрессовых факторов является увеличение образования активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса, который сопровождается перекисным окислением липидов и повреждением клеточных мембран. В настоящей работе были изучены стресс-индуцированные изменения редокс-статуса лишайника *P. canina*, а также изменения его липидного состава при действии повышенной температуры.

Показано, что воздействие неблагоприятной температуры на гидратированные талломы лишайника приводило к увеличению содержания перекиси водорода, фенолоксидазной активности, а также повышению уровня перекисного окисления липидов, что является важной составляющей стрессового ответа лишайника. Для живых организмов характерны две принципиальные стратегии, которые обеспечивают защиту от окисли-

тельного повреждения, причем они действуют независимо или совместно [2]. Первая включает изменение молекулярного состава мембран, что влечет за собой изменение проницаемости и, соответственно, доступности клеточных компонентов для токсичных продуктов, вторая основана на активации систем, обеспечивающих химическую детоксикацию АФК и свободных органических радикалов. Стресс-индуцированное изменение редокс-статуса талломов лишайника стимулировало увеличение содержания антиоксидантных агентов липофильной природы: резко возростал уровень α -токоферола, увеличивалось содержание каротиноидов, в частности β -каротина. Известно, что токоферолы тормозят перекисное окисление липидов, снижают проницаемость мембран, а также связывают свободные жирные кислоты, избыток которых дестабилизирует мембранную структуру [3]. Важным участником неферментативной антиоксидантной системы являются также каротиноиды, которые способны утилизировать свободные радикалы. Каротиноиды принимают участие в защите клеточных структур от фотодеструкции, а также могут взаимодействовать с органическими радикалами жирных кислот, действуя как ловушки [4]. Каротиноиды и токоферолы проявляют как синергизм в защите липидов от повреждающего действия свободных радикалов, так и отдельно токоферол может защищать каротиноиды от окисления, взаимодействуя с их радикалами [5].

Таким образом, при действии повышенной температуры на талломы лишайника *P. canina* наблюдается изменение редокс-статуса клеток талломов и развитие окислительного стресса, который приводит к активизации неферментативной антиоксидантной системы лишайника, в частности происходит увеличение содержания низкомолекулярных антиоксидантов липофильной природы, что является липид-опосредованным стрессовым ответом лишайника на действие повышенной температуры.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22- 14 - 00362.

Библиографические ссылки

1. Stress physiology and the symbiosis / R.P. Beckett, I. Kranner, F.V. Minibayeva // Lichen biology / ed. T.H. Nash III. Cambridge: Cambridge University Press.- 2008.- P. 134–151.
2. Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm / J.R. Gunning, G.J. Taylor // Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms / eds R.G. Alcher, J.R. Gunning. New York: Wiley-Liss.- 1990.- P. 329–356.
3. Vitamin E and its function in membranes / X. Wang, P.J. Quinn // Progress in Lipid Research.- 1999.- Vol. 38.- N 4.- P. 309–336.

4. Antioxidant effect of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview / P. Palozza, N.I. Krinsky // Methods in enzymology Carotenoids (Part A. Chemistry, separation, quantitation, and antioxidation) / ed. L. Packer. San Diego: Academic Press.- 1992.- Vol. 213.- P. 403–420.

5. Гомбоева, С.Б. Некоторые природные и синтетические антиоксиданты как стабилизаторы превращения β -каротина в витамин А/ С.Б. Гомбоева, Н.Н. Гесслер, К.Б. Шумаев, Т.И. Хомич, А.Г. Мойсеенок, В.Я. Быховский // Биохимия.- 1998.- Т. 63.- N 2.- С. 224–229.

Характеристика фотосинтетических реакций проростков *Hordeum vulgare* при совместном воздействии *Fusarium culmorum* и повышенной температуры

Вачинская А. В.^{А*}, Русакович А. А.^А, Пшибытко Н. Л.^А

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: alina6805830@gmail.com

Одним из наиболее распространённых абиотических стрессовых факторов, с которым сталкиваются растения, является повышенная температура. Особую актуальность эта проблема приобретает в связи с глобальным потеплением климата. На сегодняшний день более 40% территорий умеренной климатической зоны Земли испытывают периодические воздействия повышенных температур, вызывающих стресс у растений [1]. Более того, ухудшение экологической ситуации на планете приводит к возникновению все большего количества стрессовых воздействий и их комбинаций. Грибы рода *Fusarium* Link относятся по способу питания к факультативным паразитам, которые способны поражать растения, начиная с момента прорастания зерновок и до конца их вегетации, вызывая как корневые гнили, так и фузариоз колоса. Для нашей республика показана их высокая вредоносность в посевах зерновых культур: пшеницы, ячменя, ржи [2]. Степень поражения болезнями варьирует в зависимости от погодных условий. Поэтому исследование совместного действия стрессовых факторов биотической и абиотической природы имеет как фундаментальное, так и практическое значение.

В представленной работе исследовано влияние повышенной температуры (40°C в течение 3 ч ежедневно на протяжении четырех суток), заражения *Fusarium culmorum* и их совместного действия на параметры флуоресценции хлорофилла в проростках *Hordeum vulgare* L. сорта «Гонар». Растения выращивались в стандартизированных условиях при температуре 24°C, освещении 120-140 $\mu\text{моль квантов м}^{-2} \text{с}^{-1}$, фотопериоде день/ночь 16/8 ч, на обеднённой среде (водопроводная вода). На 7 день проростки инокулировались спорами гриба *Fusarium culmorum*. Раствор

для инокуляции содержал гомогенизированную среду, на которой выращивался гриб. Тепловая обработка проводилась в воздушном термостате при температуре 40°C и освещенности 120 $\mu\text{моль квантов м}^{-2} \text{с}^{-1}$ в течение 3 ч. Воздействие повторялось в полуденные часы на протяжении 4 суток. Оценка световых фотосинтетических реакций проводилась на РАМ-флуориметре «JUNIOR-PAM» (Walz, Германия), для визуализации флуоресценции использовался «3D IMAGING-PAM» (Walz, Германия).

Анализ роста и развития *Fusarium culmorum* выявил более интенсивное его развитие при периодическом воздействии повышенной температуры (40°C). Образцы, культивируемые в условиях теплового стресса, приобретали более интенсивную розовую окраску мицелия (рис. 1а). С обратной стороны данных чашек Петри наблюдалось выраженное окрашивание среды в розово-бордовый цвет уже к 7-10 дню вегетации (рис. 1б), в то время как в нормальных условиях культивирования изменение окраски мицелия наблюдалось только на 16-20 день культивирования. Приобретение розово-бордового окрашивания у *Fusarium culmorum* ассоциировано со спороношением [3].

Для оценки фотосинтетической активности проростков *Hordeum vulgare* L. использовался метод индукции флуоресценции хлорофилла. С использованием метода имиджа флуоресценции первого листа показано, что очаги трахеомикозного увядания, возникающие после заражения *Fusarium culmorum*, характеризуются повышением интенсивности флуоресценции хлорофилла F (рис. 2). Причем существенное повышение уровня F фиксировалось на стадии, когда некроз тканей еще не наблюдался. Комбинированное воздействие *Fusarium culmorum* и повышенной температуры приводило к увеличению числа таких очагов. В то же время параметры флуоресценции хлорофилла, регистрируемые на площади 1 см^2 в средней части первого листа, (фоновый F_0 и максимальный F_m уровень флуоресценции хлорофилла, потенциальный (F_v/F_m) и эффективный ($Y(II)$) квантовый выход фотохимических реакций ФС2) не претерпевали существенных изменений. Эффективный квантовый выход фотохимической реакции ФС2 снижался относительно контроля только на третий день при воздействии температуры совместно с заражением *Fusarium culmorum*. Максимальное падение данного показателя было зарегистрировано на 8 сутки (на $11.8 \pm 0,4$ % относительно контроля).

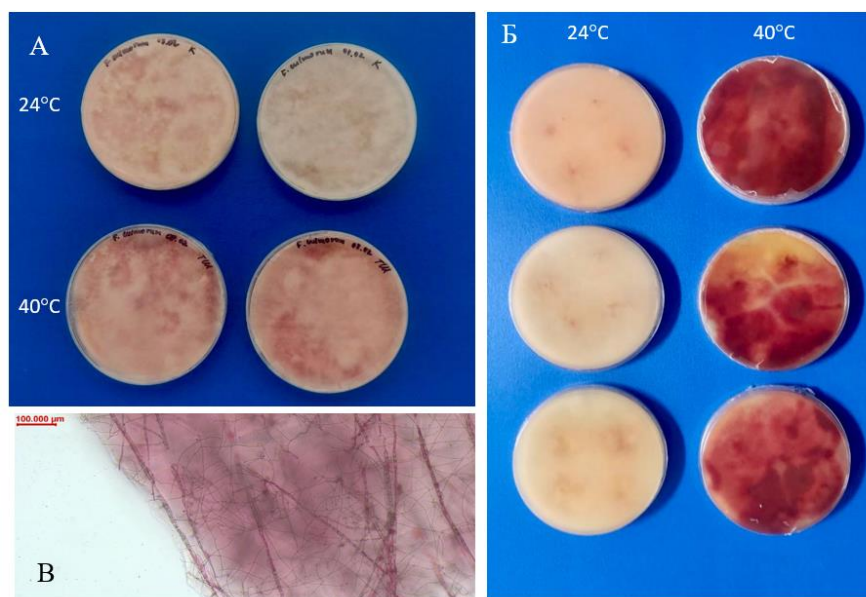


Рис 1. Внешний вид мицелия *Fusarium culmorum*, выращенного в течение 7 дней при температуре 24°C (контроль), и при периодической тепловой обработке (40°C, 3 ч, ежедневно):

а – вид сверху чашек Петри с мицелия *Fusarium culmorum*, *б* – вид снизу чашек Петри с мицелия *Fusarium culmorum*, *в* – мицелий *Fusarium culmorum*, полученный с помощью световой микроскопии

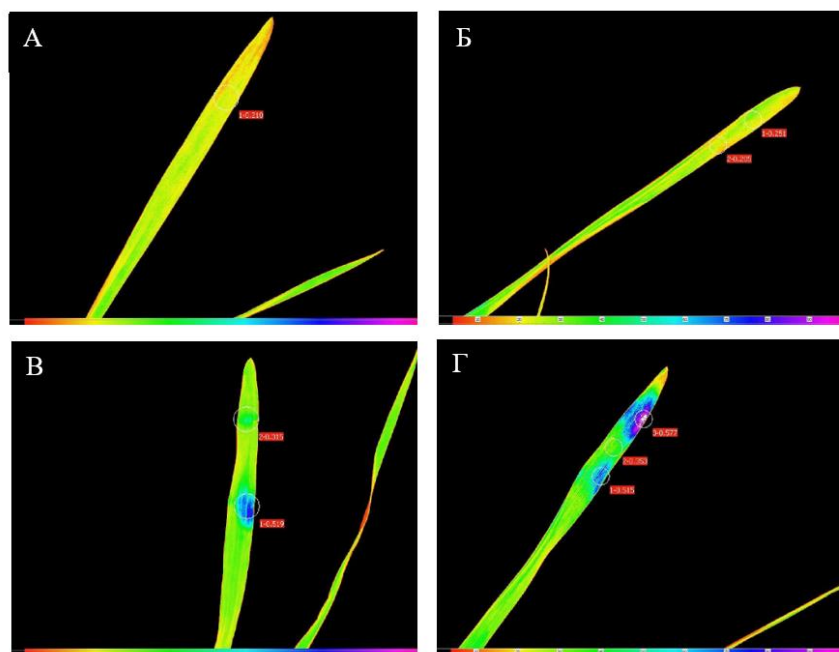


Рис. 2. Имидж флуоресценции хлорофилла листовой пластины 15-дневных проростков *Hordeum vulgare* L.:

а – без обработки; *б* – подвергшиеся периодической тепловой обработке (40°C, 120-140 $\mu\text{моль квантов м}^{-2} \text{с}^{-1}$, 3 ч в течение 4 дней) в 7-13-дневном возрасте; *в* – зараженные *Fusarium culmorum* в 7-дневном возрасте; *г* – подвергшиеся заражению *Fusarium culmorum* в 7-дневном возрасте и периодическому воздействию повышенной температуры (40°C, 120-140 $\mu\text{моль квантов м}^{-2} \text{с}^{-1}$, 3 ч) в течение 4 дней

Коэффициент фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (qP) снижался в ходе онтогенеза. Воздействие повышенной температуры ускоряло данный процесс, и снижение qP в подвергшихся периодическому воздействию теплового стресса составило $8,69 \pm 0,0818\%$ (относительно 7-дневного возраста). Заражение проростков ячменя *Fusarium culmorum* не приводило к значительному изменению показателя qP, в то время как совместное действие стрессоров снижало данный показатель на $17,1 \pm 2,8\%$ к 8 дню.

Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (NPQ) при воздействии повышенной температуры (40°C, 3 часа) статистически достоверно снижалось начиная с первого 3-часового воздействия (рис. 3). В то же время на третьи сутки было зарегистрировано статистически недостоверное повышение данного показателя. Заражение растений *Hordeum vulgare* L. *Fusarium culmorum* не влияло на коэффициент NPQ по крайней мере в течение 8 дней наблюдения после инокуляции патогена. Совместное воздействие температуры и инфицирования *Fusarium culmorum* приводило к значительному снижению NPQ спустя 3 часа. Максимальное падение NPQ (на $37,70 \pm 8,4 \%$) было зарегистрировано на третьи сутки.

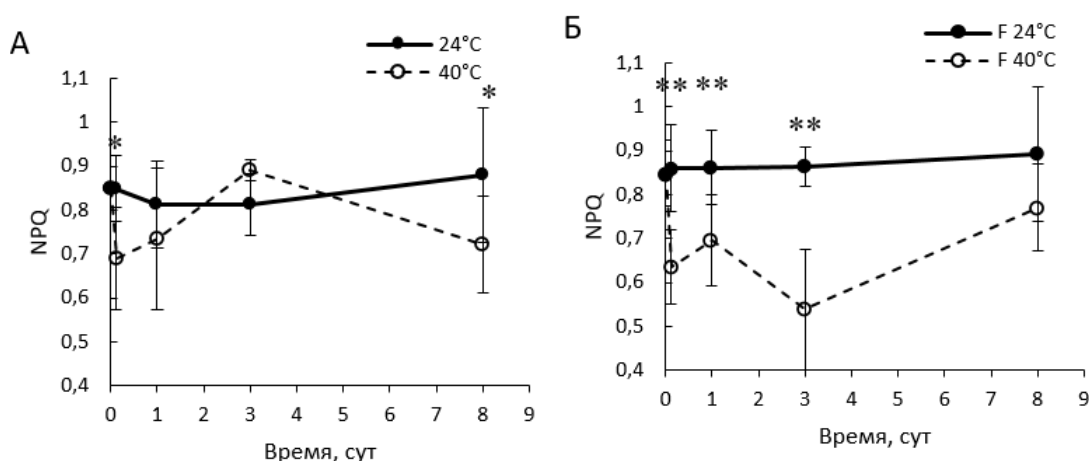


Рис. 3. Кинетика нефотохимического тушения флуоресценции Хл *a* при периодическом воздействии повышенной температуры (40°C, 3 ч) в необработанных (А) и зараженных *Fusarium culmorum* (Б);
* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

Квантовый выход светоиндуцированного (регулируемого) нефотохимического тушения флуоресценции $Y(NPQ)$ при воздействии как повышенной температуры, так и совместном действии температуры и заражения *Fusarium culmorum* снижался в первые сутки, а затем возвращался к контрольному значению. Квантовый выход нерегулируемого тепловыделения и излучения флуоресценции хлорофилла *a* $Y(NO)$ практически не изменялся в результате заражения проростков *Hordeum vulgare* L.

Fusarium culmorum, а при воздействии повышенной температуры (40°C, 3 часа) статистически не достоверно повышался начиная с третьих суток. При совместном воздействии стрессоров (*Fusarium culmorum* и повышенной температуры) $Y(NO)$ повышался с первых суток и к 8-ому дню наблюдения достигал $129,3 \pm 13,8$ % от контроля. Полученные данные указывают на нарушение процессов диссипации энергии электронного возбуждения молекул хлорофилла в антенне ФС2 или светособирающем комплексе ФС2.

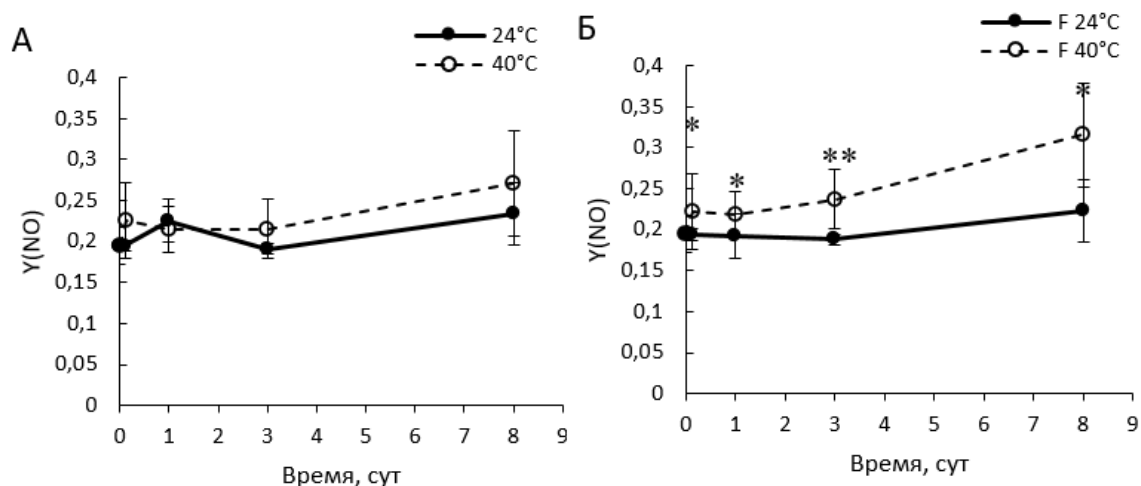


Рис. 4. Кинетика квантового выхода нерегулируемого тепловыделения и излучения флуоресценции хлорофилла *a* при периодическом воздействии повышенной температуры (40°C, 3 ч) в необработанных (А) и зараженных *Fusarium culmorum* (Б) проростках *Hordeum vulgare* L.; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

Таким образом, установлено, что совместное воздействие стрессовых факторов (повышенной температуры (40°C 3 ч) и заражение *Fusarium culmorum*) ускоряет развитие трахеомикозного увядания, а также подавляет фотосинтетическую активность *Hordeum vulgare* L., что выражается в снижении эффективного квантового выхода фотохимических реакций ФС2, подавлении нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла за счет его светоиндуцированного компонента и повышении нерегулируемого нефотохимического тушения.

Библиографические ссылки

1. Reynolds, M.P. Application of Physiology in Wheat Breeding / M.P. Reynolds, J.I. Ortiz-Monasterio, A. McNab. – 2017.
2. SEPTORIA ON CEREALS AND ITS HARMFUL EFFECT / N.A. Krupenko [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus Agrar. Ser. – 2017. – Vol. 0, № 4. – P. 66-75.
3. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat / B. Scherm [et al.] // Mol. Plant Pathol. – 2013. – Vol. 14, № 4. – P. 323-341.

Двойная роль каталаз в патосистеме *Triticum aestivum* - *Stagonospora nodorum*: фактор вирулентности или защиты

Веселова С. В.^{А*}, Бурханова Г. Ф.^А, Нужная Т. В.^{А,Б}, Румянцев С. Д.^А, Максимов И. В.^А

^А *Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук», Уфа, Россия. *E-mail: veselova75@rambler.ru*

^Б *Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук», Уфа, Россия.*

Патогены растений ежегодно вызывают серьезные потери урожая многих сельскохозяйственных культур, в том числе и пшеницы. В соответствии с современными представлениями иммунные реакции растений в ответ на атаку патогенов индуцируются на нескольких уровнях [1]. Первый уровень защиты заключается в неспецифическом узнавании патогенов, что приводит к развитию базального иммунитета, известного как РАМР-триггерный иммунитет или РТІ (от pattern triggered immunity) [1]. Второй уровень защиты сводится к специфическому узнаванию эффекторов патогенов продуктами эффекторно-специфических генов растений, называется ЕТІ (от effector-triggered immunity) и соответствует специфическому ответу ген-на-ген [1]. При атаке биотрофных патогенов ЕТІ приводит к ограничению роста патогена и развитию устойчивости. У некротрофных патогенов эффекторы подавляют РТІ и используют путь ЕТІ хозяина для развития восприимчивости, что приводит к восприимчивости, запускаемой некротрофными эффекторами (НЭ) NETS (necrotrophic effectors triggered susceptibility), это соответствует обратному взаимодействию ген-на-ген [2]. Известно, что индукция неспецифического (РТІ) и специфического (ЕТІ) иммунитета вызывает у растений сходные реакции: регуляцию генерации активных форм кислорода (АФК), перепрограммирование генома, синтез вторичных метаболитов и др. [3]. Генерация АФК – окислительный взрыв является одной из наиболее ранних ответных реакций растений на внедрение патогена и играет важную роль в иммунитете растений [4]. В настоящее время считается, что в растительно-микробном взаимодействии АФК образуются в апопласте при участии ферментов НАДФН-оксидазы, пероксидазы, супероксиддисмутаза (СОД) и оксалаксоксидазы и этот процесс строго контролируется фитогормонами салициловой (СК), жасмоновой кислотами (ЖАК), этиленом и др. [4, 5]. Однако следует отметить, что существуют сильные различия в отношении роли АФК в развитии устойчивости растений к некротрофным и биотрофным патогенам [4]. Резкое и многократное повышение содержания АФК, ведущее к окислительному взрыву и гибели клеток растения, приводит к

остановке роста биотрофных патогенов, но способствует колонизации тканей растений некротрофами [4].

Окислительный взрыв может привести к окислению и разрушению липидов, белков и ДНК в стрессовых клетках, поэтому у растений существуют антиоксидантные механизмы для борьбы с избыточным количеством АФК [6]. Детоксикация АФК в апопласте может осуществляться с помощью антиоксидантных ферментов (аскорбатпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы и др.) или низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, глутатиона, каротиноидов, α -токоферола и др.) [5]. Каталазы (CAT) считаются наиболее мощными поглотителями АФК из-за их сильного сродства к H_2O_2 [7]. Каталазы обнаружены почти во всех живых организмах, они участвуют в регуляции роста, развития и реакции на стимулы окружающей среды [4, 5, 7]. Каталазы являются уникальными антиоксидантами, разлагающими АФК напрямую без присутствия каких-либо восстановителей. Каталаза непосредственно активирует реакцию дисмутации двух молекул H_2O_2 в H_2O и O_2 [5]. Каталазы занимают особое место в растительно-микробном взаимодействии, так как способствуют усилению вирулентности некоторых грибных патогенов, за счет снижения концентрации АФК в зоне инфицирования и подавления окислительного взрыва [8]. Работа каталаз регулируется фитогормонами и микроРНК [4, 7]. СК может напрямую связываться и ингибировать каталазу, а этилен, напротив, способен активировать каталазу [4, 6]. Недавние работы показали, что экспрессия генов *CAT* может регулироваться несколькими семействами микроРНК, miR395, miR408, miR531, miR9666 и miR1137 [7].

Фитопатогенный гриб *Stagonospora nodorum* вызывает септориоз листьев и колоса яровой и озимой пшеницы [9]. Главными факторами вирулентности патогена считаются некротрофные эффекторы (НЭ), кодируемые генами *SnTox*, продукты которых взаимодействуют с продуктами генов восприимчивости растения-хозяина (*Snn*), вызывая развитие болезни [10]. На сегодняшний день охарактеризовано около десятка взаимодействий [10]. Эффекторы *SnTox1* и *SnTox3* достаточно широко распространены среди штаммов и изолятов, вызывают некроз и хлороз у восприимчивых генотипов пшеницы, несущих гены восприимчивости *Snn1* и *Snn3-B1*, соответственно, а их роль в подавлении РТІ и развитии NETS активно изучается. [10, 11]. В настоящее время считается, что основной ролью НЭ является индукция гибели клеток хозяина с помощью манипулирования редокс-статусом и гормональными путями растения [10]. Однако механизмы, лежащие в основе этих процессов, в настоящее время до конца не выяснены. Также известно, что *SnTox1-Snn1* и *SnTox3-Snn3-B1*

взаимодействия эпистатичны по отношению друг к другу, однако механизм эпистаза до конца не раскрыт [10, 11]. Ранее было выдвинуто предположение, что предполагаемый путь PTI, активируемый совместимым взаимодействием SnTox1-Snn1, может ингибировать путь ETI, активированный другим взаимодействием SnTox3-Snn3-B1. Кроме того, ранее было показано, что каталаза является фактором вирулентности SnTox3-продуцирующих изолятов *S. nodorum* [8].

В данной работе было изучено влияние SnTox3-продуцирующего изолята *S. nodorum* SnB и SnTox1-продуцирующего изолята *S. nodorum* Sn1SP на содержание перекиси водорода (H₂O₂), активность каталазы (САТ), экспрессию генов транскрипционных факторов (ТФ) гормональных сигнальных путей и экспрессию некоторых консервативных микроРНК у четырех сортов мягкой яровой пшеницы контрастных по чувствительности к НЭ SnTox1 и SnTox3 – Омская 35 (Ом35), Казахстанская 10 (Каз10), Жница и Салават Юлаев (СЮ). Также для выявления роли НЭ SnTox1 и SnTox3 в манипулировании гормональными сигнальными путями СК и этилена растения были обработаны СК и этефоном (ЕТ) (химическим предшественником этилена).

Наши результаты показали, что сорт Ом35 был нечувствителен к SnTox3 и устойчив к изоляту SnB и чувствителен к SnTox1 и восприимчив к изоляту Sn1SP (табл. 1). Сорта Каз10 и Жница, напротив, показали чувствительность к SnTox3 и восприимчивость к изоляту SnB и нечувствительность к SnTox1 и устойчивость к изоляту Sn1SP (табл. 1).

Таблица 1

Влияние обработки фитогормонами на площадь поражения на листьях трех сортов пшеницы разной степени чувствительности к НЭ SnTox1 и SnTox3 инфицированных изолятами *S. nodorum* SnB и Sn1SP.

Вариант обработки	Ом35 (<i>snn3/Snn1</i>)		Каз10(<i>Snn3/snn1</i>)		Жница(<i>Snn3/snn1</i>)	
	SnB	Sn1SP	SnB	Sn1SP	SnB	Sn1SP
<i>S. nodorum</i>	14.2 ± 0.8	50.3 ± 5.2	77.1 ± 7.3	11.2 ± 1.1	85.2 ± 7.7	2.3 ± 0.2
<i>S. nodorum</i> +СК	12.2 ± 0.2	63.7 ± 7.1	15.2 ± 0.6	18.5 ± 2.5	25.8 ± 2.1	31.7 ± 3.7
<i>S. nodorum</i> +ЕТ	75.3 ± 5.6	27.7 ± 3.4	94.7 ± 8.4	12 ± 1.6	95.6 ± 4.2	15.7 ± 1.5

Примечание: Площадь листьев и площадь зон поражения измеряли через 6 дней после инфицирования изолятами патогена. Площадь зон поражения представлена в % от общей площади листа, которая принята за 100%. СК – салициловая кислота, ЕТ – этефон, химический предшественник этилена.

Обработка СК повышала устойчивость SnTox3-чувствительных сортов к изоляту SnB и снижала устойчивость SnTox1-чувствительного сорта к изоляту Sn1SP (табл. 1). Обработка ЕТ, напротив, повышала устойчивость SnTox1-чувствительного сорта к изоляту Sn1SP и снижала устойчивость всех сортов к изоляту SnB (табл. 1). У сорта Ом35 активность САТ

снижалась, а содержание H_2O_2 повышалось при инфицировании изолятами SnB и Sn1SP (табл. 2). Однако в первом случае это приводило к устойчивости, а во втором к восприимчивости. У сорта Жница мы обнаружили противоположную реакцию. Активность САТ повышалась, а содержание H_2O_2 снижалось при инфицировании изолятами SnB и Sn1SP, и это приводило в первом случае к восприимчивости, а во втором случае к устойчивости (табл. 2).

Таблица 2

Влияние обработки фитогормонами на содержание перекиси водорода (H_2O_2) и активность каталазы (САТ) в листьях трех сортов пшеницы разной степени чувствительности к НЭ SnTox1 и SnTox3 инфицированных изолятами *S. nodorum* SnB и Sn1SP.

Параметр	Обработка	Время, ч	Ом35 (<i>snn3/Snn1</i>)		Каз10(<i>Snn3/snn1</i>)		Жница(<i>Snn3/snn1</i>)	
			SnB	Sn1SP	SnB	Sn1SP	SnB	Sn1SP
Содержание H_2O_2	Контроль	24	19.0 ± 1.9	20 ± 1.8	19.4 ± 1.6	20 ± 2	20.6 ± 1.9	21 ± 2.0
		72	20.5 ± 2	22 ± 2	18.7 ± 1.7	13 ± 1.1	18.7 ± 1.4	13.6 ± 1.0
	Sn	24	30.3 ± 3	36 ± 3.2	21.4 ± 1.9	32 ± 2.5	19.8 ± 1.7	24 ± 2.1
		72	21.1 ± 2	18 ± 1.5	15.3 ± 1.1	11 ± 0.8	15.2 ± 1.2	14 ± 0.8
	Sn+СК	24	42.5 ± 3.5	55 ± 4.8	45.7 ± 3.8	30 ± 2.7	48.6 ± 4.1	59.3 ± 4.4
		72	24.0 ± 2.1	20.8 ± 2	23.8 ± 2.1	19 ± 1.5	20.3 ± 2.1	12 ± 0.7
	Sn+ЕТ	24	17.5 ± 1.8	17 ± 1.1	16.6 ± 2.2	15.7 ± 1.2	15.6 ± 1.1	21.1 ± 1.8
		72	15.9 ± 1.7	10 ± 0.8	14.7 ± 1.4	5.1 ± 0.5	14.2 ± 0.9	13 ± 0.9
Активность САТ	Контроль	24	326 ± 35	386 ± 35	359 ± 38	398 ± 36	326 ± 28	342 ± 25
		72	345 ± 31	395 ± 38	365 ± 32	375 ± 45	342 ± 25	360 ± 32
	Sn	24	268 ± 25	250 ± 21	606 ± 52	253 ± 23	700 ± 63	601 ± 55
		72	312 ± 30	316 ± 28	632 ± 56	417 ± 45	755 ± 68	361 ± 3
	Sn+СК	24	208 ± 21	225 ± 18	304 ± 35	276 ± 25	321 ± 28	265 ± 20
		72	182 ± 15	272 ± 26	263 ± 22	204 ± 18	281 ± 21	248 ± 22
	Sn+ЕТ	24	696 ± 51	627 ± 56	612 ± 60	493 ± 30	726 ± 56	430 ± 35
		72	670 ± 56	725 ± 69	589 ± 59	715 ± 61	730 ± 70	315 ± 24

Примечание: Содержание H_2O_2 (мкМ H_2O_2 / мг сырой массы), активность САТ (мкМ H_2O_2 /мг белка* мин). Sn – *S. nodorum*.

Обработка растений СК ингибировала активность САТ у всех сортов при инфицировании изолятами SnB и Sn1SP, что приводило к накоплению H_2O_2 и окислительному взрыву (табл. 2). Обработка растений ЕТ повышала активность САТ у всех сортов при инфицировании изолятами SnB и Sn1SP, что приводило к снижению содержания H_2O_2 (табл. 2). Анализ транскрипционной активности генов ТФ гормональных сигнальных путей показал, что при инфицировании изолятом SnB у SnTox3-чувствительных сортов индуцировался этиленовый сигнальный путь, повышалась транскрипция генов *EIN3*, *ERF1* и *WRKY53*, а у SnTox3-нечувствительного сорта активировался СК-сигнальный путь, накапливались транскрипты гена *WRKY13*. При инфицировании изолятом Sn1SP у SnTox1-

чувствительного сорта индуцировался СК-сигнальный путь, накапливались транскрипты гена *WRKY13*, а у SnTox1-нечувствительных сортов активировался этиленовый сигнальный путь, повышалась транскрипция генов *EIN3*, *ERF1* и *WRKY53*.

Результаты работы показали, что сигнальный путь СК участвует в развитии восприимчивости к НЭ SnTox1 и устойчивости к НЭ SnTox3, а сигнальный путь этилена участвует в развитии устойчивости растений пшеницы к НЭ SnTox1 и в развитии восприимчивости к НЭ SnTox3. НЭ SnTox1 захватывает сигнальный путь СК и использует его для подавления активности САТ, накопления H_2O_2 и формирования некроза и одновременного подавления сигнального пути этилена с помощью СК. НЭ SnTox3 захватывает сигнальный путь этилена и использует его для подавления накопления H_2O_2 и одновременного подавления сигнального пути СК. На основе результатов данной работы раскрывается возможный механизм эпистаза между двумя НЭ SnTox1 и SnTox3, который может быть связан с захватом и манипулированием НЭ гормональных путей у растений.

Мы предполагаем, что НЭ манипулируют гормональными сигнальными путями для регулирования экспрессии растительных микроРНК, которые отвечают за тонкую настройку всей транскрипции во всем растении. Все больше данных показывает, что микроРНК участвуют в РТИ и ЕТИ в ответ на вирусы, грибы и бактерии. В частности, микроРНК участвуют в регуляции различных защитных сигналов и путей, включая гормональные сигналы и продукцию АФК [12, 13]. В данной работе изучена экспрессия девяти консервативных микроРНК (миР156, миР159, миР160, миР164, миР166, миР393, миР396, миР398 и миР408) у четырех генотипов пшеницы сортов Ом35, Каз10, Жница и СЮ на ранних стадиях заражения изолятом *S. nodorum* SnB. Известно, что все исследованные в данной работе консервативные микроРНК регулируют процессы роста и развития растений, а также участвуют в ответе на абиотические и биотические воздействия [13]. Наши результаты показали, что все девять микроРНК были активированы у SnTox3-нечувствительного сорта Ом35, инфицированного изолятом SnB. У SnTox3-чувствительных сортов НЭ SnTox3 подавлял экспрессию четырех микроРНК (миР159, миР166, миР393 и миР408), что говорит об участии этих микроРНК в развитии устойчивости к SnTox3-продуцирующему изоляту. Функции двух микроРНК миР159 и миР408 при атаке патогена связаны с регуляцией окислительно-восстановительного метаболизма у растений [12]. Недавно было показано, что миР408 пшеницы нацелена на гены каталазы [14]. А мишенью для миР159 являются ферменты СОД и пероксидаза [7].

Для проверки влияния миР408 на ее гены мишени - *TaCAT2-A*, *TaCAT2-B*, были синтезированы in vitro модифицированные оцРНК408-F

и оцРНК408-R (одноцепочечные РНК) и получена дцРНК408 (двуцепочечная РНК) с добавлением на 3'-конец метилированного кэпа, а на 5' конец фосфатной группы для защиты молекул от действия различных нуклеаз. Растения сорта Каз10 были обработаны дцРНК408 с помощью техники SIGS (спрей-индуцированного сайленсинга генов) и инфицированы изолятом SnB. Симптомы заболевания на опрысканных дцРНК408 растениях практически отсутствовали, патоген не мог размножаться, при этом мы обнаружили накопление H_2O_2 , снижение активности каталазы и уменьшение экспрессии генов *TaCAT2-A* и *TaCAT2-B* у таких растений.

Таким образом, роль каталазы в развитии устойчивости пшеницы или вирулентности патогена будет зависеть от наличия НЭ у изолята патогена. Патогены развили различные стратегии нападения и для этого синтезируют различные НЭ. НЭ SnTox1 и SnTox3 противоположно влияют на сигнальный путь СК для регуляции активности каталазы. При этом вовлекаются механизмы РНК-интерференции и гормональные сети посредством регуляции экспрессии ТФ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00266.

Библиографические ссылки

1. Jones J.D.G., Dang J.L. The plant immune system // Nature. 2006. Vol. 444. P. 323-329. doi: 10.1038/nature05286.
2. Tan K.C., Oliver R.P., Solomon P.S., Moffat C.S. Proteinaceous necrotrophic effectors in fungal virulence // Functional Plant Biology. 2010. Vol. 37. P. 907–912. DOI:10.1071/FP10067.
3. Ngou B.P.M., Ding P., Jones J.D.G. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system // The plant cell. 2022. Vol. 34. P. 1447–1478. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>.
4. Barna B., Fodor J., Harrach B.D., Pogány M., Király Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 59. P. 37–43. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.01.014
5. Podgórska A., Burian M. and Szal B. Extra-Cellular But Extra-Ordinarily Important for Cells: Apoplastic Reactive Oxygen Species Metabolism. Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1353. doi: 10.3389/fpls.2017.01353
6. Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. Front. Plant Sci. 2016. 7:187. doi: 10.3389/fpls.2016.00187
7. Zhang Y., Zheng L., Yun L., Ji L., Li G., Ji M., et al. Catalase (CAT) Gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.): evolution, expression pattern and function analysis. Int. J. Mol. Sci. 2022; 23: 542. doi: 10.3390/ijms23010542
8. Maksimov I.V., Yarullina L.G., Burkhanova G.F., Zaikina E.A. Relationship between the aggressiveness and catalase activity of *Septoria nodorum* Berk. in wheat. Biology Bulletin. 2013. V. 40. № 5. P. 441-446. doi: 10.1134/s1062359013050099
9. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Khusnutdinova E.K., Maksimov I.V. Ethylene-cytokinin interaction determines early defense response of

wheat against *Stagonospora nodorum* Berk. // Biomolecules. 2021. Vol. 11. P. 174. <https://doi.org/10.3390/biom11020174>.

10. Haugrud A.R.P., Zhang Z., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of resistance to *Septoria nodorum* blotch in wheat // Theoretical and Applied Genetics. 2022. Vol. 135. P. 3685–3707. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04036-9>.

11. Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E., Breen S., Solomon P.S., Oliver R.P., et al. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease. *Plant J.* 2016; 87: P. 343–354. doi: 10.1111/tpj.13203

12. Yang X., Zhang L., Yang Y., Schmid M., Wang Y. miRNA mediated regulation and interaction between plants and pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 2913. doi: 10.3390/ijms22062913

13. Jiang C-H., Li Z-J., Zheng L-Y., Yu Y-Y., Niu D-D. Small RNAs: Efficient and miraculous effectors that play key roles in plant–microbe interactions. *Mol. Plant Pathol.* 2023; 7. doi: 10.1111/mpp.13329

14. Li Y., Lu Y.G., Shi Y., Wu L., Xu Y.J., Huang F., et al. Multiple rice MicroRNAs are involved in immunity against the blast fungus *magnaporthe oryzae*. *Plant Physiol.* 2014; 164: 1077–1092. doi: 10.1104/pp.113.230052

Воздействие гипоксии в комбинации с депривацией N, S и Cu на рост и продукцию биоводорода клетками *Parachlorella kessleri*

**Вечерек М. С.^А, Мыслейко М. А.^А, Савицкий А. С.^А,
Мацкевич В. С.^А, Соколик А. И.^А, Самович Т. В.^Г, Козел Н. В.^{В,Д},
Маноян Д. Г.^Б, Габриелян Л. С.^Б, Муравицкая А. О.^А,
Демидчик В. В.^А**

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь

^Б Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии, Ереван, Армения

^В Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

^Г Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

^Д КФХ «Серебряный ручей»

Некоторые водоросли, благодаря наличию гидрогеназы, способны продуцировать H₂ в ходе, так называемого «биофотолиза». Выделяют прямой и непрямой биофотолиз. В первом случае электроны для восстановления водорода поступают от H₂O, во втором от органических соединений. Индукция гидрогеназ стимулируется анаэробнозом. Также активность гидрогеназ может увеличиваться при депривации N, P, K, S. Целью настоящей работы являлось установление особенностей роста и продукции H₂ зелёными микроводорослями *Parachlorella kessleri* в условиях

анаэробноз и депривации N, S и Cu. В результате проведенных исследований было показано снижение удельной скорости роста культур клеток, продуцирующих биоводород на средах депривированных по N, S и Cu по отношению к контрольной среде. Пики накопления биоводорода были зафиксированы на 6 сут анаэробного культивирования для среды без N ($7,43 \pm 1,49$ ммоль г сухой массы⁻¹), на 2 сутки для среды без S и Cu ($10,46 \pm 2,84$ ммоль г сухой массы⁻¹). Концентрация общего белка в данных культурах росла на контрольной среде до 257,5% от изначального значения, на средах без N, без S и Cu наблюдался рост до 25,7% и 95,4%, соответственно, относительно изначального показателя. Высокий выход H₂ и белка, обнаруженный при депривации N, S и Cu, указывает на потенциальную возможность использования данных условий для производства биоводорода и одновременно белка. Кроме того, обнаруженный стимулирующий эффект депривации по S и Cu указывает на вовлечённость Cu-содержащих ферментов в поддержание редокс-баланса при синтезе H₂. Так как основным пулом белков, содержащих медь, являются пластоцианин, комплекс IV митохондриальной ЭТЦ и медные оксидазы, то представляется актуальным дальнейшее исследование роли данных систем в синтезе H₂.

Тепловой стресс у лишайников рода Пельтигера: роль фотосинтетических пигментов

**Галеева Е. И.^{A*}, Хайруллина А. Ф.^A, Рахматуллина Д. Ф.^A,
Хабибрахманова В. Р.^A, Гурьянов О.П.^A, Валитова Ю. Н.^A,
Минибаева Ф. В.^A**

^A Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия.

*E-mail:kgu@mail.ru

Лишайники представляют собой сложные симбиотические ассоциации, между грибами (микобионтами) и водорослями и/или цианобактериями (фотобионтами). Известно, что ареал обитания лишайников чрезвычайно широк, и они могут расти в экстремальных условиях, непригодных для существования других фотосинтезирующих организмов. Интересной группой лишайников являются лишайники порядка Пельтигеровые, широко распространенные по всему миру и произрастающие в умеренном климате. Пельтигеровые отличаются высокими темпами роста и активным редокс-метаболизмом [1]. Данные лишайники интересны для изучения фотосинтеза и пигментного состава, так как имеют относительно высокое содержание фотобионта и, следовательно, богаты пигментами и обладают высокой фотосинтетической активностью [2].

Известно, что у растений большой вклад в защиту фотосинтетического аппарата вносят каротиноиды: они проявляют антиоксидантную активность, защищают от УФ-лучей, действуя как экранирующие пигменты, и повышают устойчивость фотосинтетических мембран, связываясь с белками и липидами [3]. Представляет интерес изучение роли данных пигментов в стрессовой устойчивости лишайников.

Целью данного исследования было выявление вклада фотосинтетических пигментов в формирование стратегии стрессового ответа исследуемых лишайников на действие повышенной температуры с учетом особенностей их симбионтов. *P. aphthosa* в отличие от *P. canina* является трехкомпонентным лишайником, в его состав помимо цианобактерии *Nostoc* входит зеленая водоросль *Coccomyxa*. Для создания стресса талломы лишайника инкубировались в климатической камере при температуре + 40 °С в течение 3 ч с поддержанием постоянной влажности. Контролем служили гидратированные талломы лишайников, не подвергнутые стрессовой обработке. Для более глубокого понимания процессов, происходящих в фотосинтетическом аппарате лишайников в условиях высокотемпературного стресса, нами были проанализированы пигментный состав лишайников и их фотосинтетическая активность.

Температурный стресс является достаточно обычным явлением для лишайников, произрастающих зачастую в неблагоприятных условиях. Известно, что важной составляющей стрессового ответа живого организма на воздействие абиотических стрессовых факторов является увеличение образования активных форм кислорода (АФК) [4] и развитие окислительного стресса. Ранее нами было показано, что в лишайниках при действии повышенной температуры возрастает уровень перекисного окисления липидов, содержание перекиси водорода, что свидетельствует об изменении редокс-статуса клеток [5]. Система антиоксидантной защиты клеток, наряду с ферментами, включает в себя и низкомолекулярные антиоксиданты, такие как каротиноиды. Каротиноиды являются активными поглотителями синглетного кислорода в растениях и участвуют в механизмах фотозащиты и стабилизации фотосинтетического аппарата [6].

Установлено, что воздействие повышенной температуры значительно повлияло на флуоресценцию хлорофилла α лишайников рода *Peltigera*. Сравнение фотосинтетической активности контрольных образцов исследуемых лишайников показало, что у *P. aphthosa* некоторые показатели фотосинтеза значительно выше, чем у *P. canina*, что может свидетельствовать о более развитой фотосинтетической системе у *P. aphthosa*. При воздействии повышенной температуры наблюдается снижение максимальной фотохимической эффективности ФС II (F_v/F_m) у обоих видов лишайников, причем у *P. canina* этот показатель уменьшился

в большей степени – в 3,4 раза. Скорость потока электронов через фотосистемы и индекс жизнениности также в большей степени снижались у *P. canina* по сравнению с *P. aphthosa*.

ВЭЖХ-анализ показал, что преобладающим каротиноидом в лишайнике *P. aphthosa* является лютеин, также показано наличие β -каротина, α -каротина, виолоксантина, неоксантина, зеаксантина, и нескольких неидентифицированных каротиноидов. На присутствие в лишайнике зеленой водоросли *Scoyotuxa* указывает наличие в составе пигментов хлорофилла *b*. При действии повышенной температуры на гидратированные талломы лишайника *P. aphthosa* происходило уменьшение содержания всех обнаруженных пигментов, как хлорофиллов, так и каротиноидов.

Было обнаружено, что преобладающим каротиноидом лишайника *P. canina* является β -каротин, кроме того, показано наличие неоксантина, виолоксантина, антераксантина, кантаксантина, зеаксантина, лютеина и нескольких неидентифицированных каротиноидов. В отличие от *P. aphthosa*, в лишайнике *P. canina* температурное воздействие приводило к значительному увеличению общего пула пигментов, как каротиноидов, так и хлорофиллов. Увеличение общего пула каротиноидов может быть направлено на защиту фотосинтетического аппарата лишайника от разрушительного действия АФК.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что несмотря на близкое родство исследуемых лишайников, в условиях высокотемпературного стресса, они демонстрируют две различные пигмент-опосредованные стратегии стрессового ответа. Изменения каротиноидного спектра может быть частью антиоксидантного ответа клеток лишайников на действие повышенной температуры. Судя по физиологическим показателям, *P. aphthosa* более успешно справляется со стрессовым воздействием, возможно, обусловлено усилением фотосинтетического аппарата лишайника дополнительным фотобионтом – зеленой водорослью *Scoyotuxa*. Показано, что различия в пигментном составе лишайников *P. canina* и *P. aphthosa* обуславливают специфичность их стрессового ответа на действие повышенной температуры.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН и при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-14-00362.

Библиографические ссылки

1. Beckett R.P., Minibayeva F.V., Vylegzhanina N.N. Tolpysheva T. High rates of extracellular superoxide production by lichens in the suborder *Peltigerineae* correlate with indices of high metabolic activity // Plant, Cell and Environment. 2003.- Vol. 26.- P. 1827–1837.

2. Котлова, Е. Р. Антиокислительные системы лишайников: дисс. канд. биол. наук: 03.00.1203.00.24 / Котлова Екатерина Робертовна; Ботанический институт им. В. Л. Комарова. – Санкт-Петербург, 2000. – 199 с.
3. Ладыгин В. Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей. / В. Г. Ладыгин // Вопросы современной альгологии. – Пуццино, 2014. – 87 с.
4. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system // *Journal of Experimental Botany*. 2002.- Vol. 53.- P. 1367–1376.
5. Валитова Ю.Н., Хабибрахманова В.Р., Гурьянов О.П., Уваева В.Л., Хайруллина А.Ф., Рахматуллина Д.Ф., Галеева Е.И., Трифонова Т.В., Викторова Л.В., Минибаева Ф.В. // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023.- Т.13.- № 4.- С.532-542.
6. Hashimoto H., Uragami C., Cogdell R.J. “Carotenoids and photosynthesis,” in *Carotenoids in Nature*. Springer: Cham, Switzerland, 2016. P. 111

Механизмы регуляции разных сценариев ксилогенеза на примере карельской березы: взаимодействие ауксинового и АФК-сигналинга

**Галибина Н. А.^{А*}, Мощенская Ю. Л.^А, Тарелкина Т.В.^А,
Никерова К. М.^А, Горшкова Т. А.^Б, Горшков О. В.^Б,
Корженевский М. А.^А, Серкова А. А.^А, Чирва О. В.^А**

^А *Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия.*

*E-mail: 181102@mail.ru

^Б *Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия.*

В последнее время во всем мире растет интерес к изучению молекулярных механизмов, регулирующих формирование тканей ствола древесных растений. Поиск путей эффективного управления ксилогенезом актуален как с точки зрения повышения продуктивности растений, так и получения древесины с заданными свойствами. Все многообразие структурных элементов флоэмы и ксилемы образуется из стволовых клеток латеральной меристемы – камбия. Несмотря на впечатляющие достижения в клеточной, молекулярной и структурной биологии, наше понимание взаимодействия сигнальных путей при разных сценариях ксило- и флоэмогенеза даже для модельных растений *Arabidopsis* и *Populus* все еще фрагментарно.

Объектами нашего исследования являются две формы березы повислой: обычная береза повислая (*Betula pendula* Roth var *pendula*) с типичной

для вида прямослойной древесины и карельская береза (*B. pendula* var. *carelica* (Merckl.) var. *Hämet-Ahti*) с узорчатой (аномальной по структуре) древесиной ствола. Хорошо известно, что растения карельской березы различаются между собой по времени начала и моделям развития узорчатой древесины в онтогенезе, у некоторых деревьев узорчатая древесина формируется только на одной стороне ствола. Участки со структурными аномалиями в древесине карельской березы содержат гораздо меньше сосудов по сравнению с древесиной обычной березы. Структурные нарушения в ксилеме карельской березы тесно связаны с изменением строения проводящей флоэмы: узорчатые деревья карельской березы формируют более узкие приросты проводящей флоэмы, содержащие меньшее число ситовидных трубок, по сравнению с деревьями березы повислой. Рисунок древесины карельской березы создается в результате изменения программ дифференцировки производных камбия: вместо сосудов, волокон, ситовидных элементов образуются крупные скопления клеток паренхимы.

Сниженная плотность сосудов в узорчатой древесине карельской березы так же, как и нарушение их пространственной ориентации, указывают на снижение свободного (физиологически активного) ауксина. Мы выявили, что уровень экспрессии *BpARF5*, ключевого регулятора ауксин-зависимого формирования сосудистого рисунка, в аномальных участках карельской березы существенно понижен со стороны камбиальной зоны и, особенно, в дифференцирующейся ксилеме, по сравнению с прямослойной древесиной обычной березы. Ранее мы идентифицировали гены, кодирующие основные ферменты биосинтеза, транспорта и конъюгации ауксина, и изучили паттерны их экспрессии при разных сценариях ксилонеза. Мы показали, что у карельской березы формирование тканей ствола происходит при повышенной экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез ауксина (*Yucca*), полярный транспорт ауксина (*PIN*) и конъюгацию ауксина с аминокислотами (*GH3*) и УДФ-глюкозой (*UGT84B1*). Вероятно, инактивация ауксина является важной составляющей механизма нарушения структуры древесины у карельской березы. Высказано предположение, что карельскую березу можно рассматривать, как ауксин-дефицитный фенотип.

Мы идентифицировали транскриптомные профили развивающихся тканей ствола у двух форм березы повислой и выявили дифференциально экспрессируемые гены (DEGs) у узорчатых растений карельской березы в период формирования поздней флоэмы. Комплекс тканей, отобранных для анализа транскриптома, включал делящиеся и дифференцирующиеся ткани (несколько слоев дифференцирующейся ксилемы, расположенных рядом с камбием, камбиальную зону, дифференцирующиеся клетки позд-

ней флоэмы), а также активно функционирующие внутренние слои флоэмы. Транскриптомное профилирование было реализовано на платформе Illumina NovaSeq 6000 / NovaSeq X Plus (Novogene). В общей сложности у березы повислой 64.3 % (18918 из 29414) всех транскриптов экспрессировались в исследованных тканях ствола. Из них дифференциально экспрессируемых генов (DEGs) – 1168 ($p_{\text{adj.}} < 0.01$ и $\text{Log}_2(\text{FC}) > / < 2$). Среди DEGs 75 экспрессировались в анализируемых тканях только у *B. pendula* var. *pendula*, 465 – только у *B. pendula* var. *carelica*, 563 – у обеих форм березы. В докладе обсуждаются некоторые пути, связанные с (1) метаболизмом триптофана и синтезом ауксина, (2) MAPK (mitogen activated protein kinase) сигнальным путем; (3) путем взаимодействия растения с патогеном (plant-pathogen interaction), а также (5) биосинтезом вторичных метаболитов.

Одним из механизмов инактивации ауксина, наряду с конъюгацией и депонированием во внутриклеточных компартментах, является окисление гормона. У различных растений идентифицирована небольшая группа генов DAO, кодирующих oxxygenase superfamily protein со специфической ИУК-оксидазной активностью (DAO; 2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxxygenase superfamily protein [KO:K23947] [EC:1.14.11.-]). Установлено, что гены DAO специфичны для покрытосеменных и не присутствуют в геномах растений других систематических групп, в том числе голосеменных. Мы показали, что экспрессия DAO в 2-2.5 раз выше в тканях ствола карельской березы, по сравнению с обычной березой повислой. Роль генов DAO в поддержании гомеостаза ауксина в тканях покрытосеменных древесных растений в настоящее время до конца не изучена.

Считается, что ослабление рецепции ауксина и его сигналинга усиливает толерантность к пероксиду водорода – одной из основных АФК. В докладе рассматривается роль регуляторной системы обратной связи LBD (*LBD* – гены, содержащие LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) DOMAIN) – АФК, которая, как было показано на примере растений *Arabidopsis*, участвует в поддержании редокс-гомеостаза, специфичного для камбия и радиального роста. Установлено, что фактор транскрипции LBD11 активирует экспрессию нескольких ключевых генов метаболизма АФК, включая *RBOH D, F* (*RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS D, F*), а также *PEROXIDASE*, для генерации локальных максимумов АФК в камбии, которые, в свою очередь, усиливают пролиферацию камбиальных клеток. По механизму отрицательной обратной связи более высокие уровни АФК затем подавляют экспрессию *LBD11* и поддерживают баланс пролиферации камбиальных клеток.

Существует достаточное количество сведений о том, что пероксид водорода может регулировать ауксиновый сигналинг, тем самым, влияя

на ростовые процессы в растениях. Было показано, что пероксид водорода подавляет экспрессию ауксин-зависимых генов через активацию MAPK каскада (ANP1–MPK3/6; MEKK1–MPK4), который играет ключевую роль в передаче сигналов окружающей среды и связывает сигналы от внешних стимулов с изменениями в клеточной организации или экспрессии генов. Модули MAPK фосфорилируют последующие сигнальные мишени, включая другие киназы, ферменты, цитоскелетные белки или факторы транскрипции. Мы установили, что 22 DEGs (гомологичны 15 генам *Arabidopsis*) были вовлечены в MAPK сигнальный путь растений у *B. pendula*. Дифференциальная экспрессия была показана для генов, вовлеченных в ответ на стимулы, связанные с АФК и влиянием патогенов (pathogenic infections). Выявленные DEGs представляют (1) модуль MAPKKK-MAPKK-MAPK, (2) гены, кодирующие вышерасположенные рецепторы, а также (3) нижерасположенные мишени. Среди генов модуля MAPKKK-MAPKK-MAPK, дифференциальная экспрессия показана для *MPK3* (mitogen-activated protein kinase) и *MKK9* (mitogen-activated protein kinase kinases). Среди рецепторов дифференциальная экспрессия показана для *OXI1* (*OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1*), кодирующих серин/треонин киназу, чувствительную к широкому спектру H_2O_2 – генерируемых стимулов. Среди ниже MAPK-каскада расположенных мишеней дифференциальная экспрессия показана, в том числе, для генов *PR1* (*PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1*) и *RBOHD*, *RBOHF*, кодирующих НАДФН-оксидазы, связанные с плазматической мембраной, и играющих важную роль в сигнальных путях, где в качестве первичных мессенджеров выступают АФК. Мы получили, что гены, гомологичные *MKK9*, *MPK3*, *RBOHD*, *PR1*, высоко экспрессировались ($TGR > 1000$) у карельской березы. Гены, гомологичные *RBOHF*, *PR1*, были уникальны для карельской березы и не экспрессировались ($TGR < 16$) у обычной березы повислой.

Идентификация и исследование экспрессии генов в процессах нормального и аномального ксилогенеза позволяет глубже и всесторонней постигнуть механизмы регуляции образования тканей ствола в норме. В этой связи, обычную березу повислую и ее форму – карельскую березу, можно рассматривать как уникальные объекты для изучения регуляции ксило- и флоэмогенеза у древесных растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН).

Как засуха и сероводород меняют структуру мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха

**Герасимов Н. Ю.^{А*}, Неврова О. В.^А, Жигачева И. В.^А,
Генерозова И. П.^Б, Голощапов А. Н.^А**

^А Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия *E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

^Б Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия

Семена растения в период прорастания очень уязвимы к внешним воздействиям, в том числе, к обезвоживанию. В этих условиях активизируется сигнальная система защиты растения, в состав которой входит сероводород (H_2S). Предполагают, что в ответ на стресс сероводород регулирует активность антиоксидантных ферментов: аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы, гваяколпероксидазы, каталазы супероксиддисмутазы (СОД). Это приводит к снижению уровня активных форм кислорода (АФК), H_2O_2 , супероксид-аниона, продуктов окисления липидов, и, в свою очередь, может влиять на целостность мембраны.

Поэтому было интересным изучить влияние засухи на изменение структуры мембран в период прорастания семян и активность защитных ферментов, например, СОД, при действии экзогенного NaHS.

Исследования проводили на митохондриях пятидневных этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L., сорт Немчиновский 100. Митохондрии выделяли из эпикотилей проростков гороха всех исследуемых групп методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере. Регистрацию потребления кислорода митохондриями проводили полярографическим методом, используя полярограф LP-7 и кислородный электрод типа Кларка. Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов, таких как стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I, липидный) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидрокарболин-3-оксил (зонд II, белковый).

Для оценки структуры мембран были получены температурные зависимости времен вращательной корреляции зондов I и II для контрольной группы и при воздействии NaHS в дозах $6 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-6}$ М. Показано, что обработка семян NaHS приводила к сдвигу обоих термоиндуцированных переходов липидных и прибелковых областей мембран митохондрий в область более низких температур относительно контроля. Это указывает на уменьшение кристалличности липидного бислоя. Кроме того, микро-

вязкость обеих областей мембран митохондрий была увеличена. Такое изменение микровязкости мембран митохондрий на фоне уменьшения их кристалличности может быть объяснено одновременным накоплением осмолитов и увеличением активности антиоксидантных ферментов при воздействии экзогенного NaHS. При этом, количество АФК уменьшалось, что приводило к накоплению ненасыщенных жирных кислот, тем самым приводя к уменьшению кристалличности липидного бислоя. Также, были изучены биоэнергетические характеристики митохондрий.

Влияние донора оксида азота (II) на структуру мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха

**Герасимов Н. Ю.^{А*}, Неврова О. В.^А, Жигачева И. В.^А,
Крикунова Н. И.^А, Генерозова И. П.^Б, Голощанов А. Н.^А**

^А *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия, *E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com*

^Б *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия*

Донор оксида азота натрий-μ2-дитиосульфатотетранитрозил-диферрат тетрагидрата (ТНКЖ-тио) способен защищать растения от температурного шока путем предотвращения дисфункции митохондрий. При этом, ТНКЖ-тио, генерируя NO и комплекс $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]$, может обладать амбивалентными свойствами. Выработка большого количества активных форм кислорода на мембранах митохондрий может приводить к увеличению уровня пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и окислительному стрессу, влияя на структуру и состав мембран. Поэтому целью работы была изучить действие ТНКЖ-тио на структуру мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха в норме.

Кристаллический водорастворимый донор оксида азота ТНКЖ-тио был синтезирован в Институте проблем химической физики РАН (Черноголовка, Московская обл.). Контрольные семена гороха сорта Немчиновский 100 замачивали в воде, опытные семена – в 10^{-8} М и 10^{-4} М ТНКЖ-тио в течение 1 ч. Митохондрии выделяли из эпикотилей проростков гороха методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере. Для приготовления образца митохондрии разбавляли в среде выделения таким образом, чтобы содержание белка в конечном растворе составляло 2 мг/мл. Из полученных ЭПР-спектров спиновых зондов рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле

$\tau_c = 6.65 \cdot 10^{10} \cdot \Delta H_{+} \times ((I_{+}/I_{-})^{0.5} - 1)$. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (рис. 1, зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксил.

В работе было изучено влияние инкубации семян гороха с ТНКЖ-тио в концентрациях 10^{-8} М и 10^{-4} М на изменение структурного состояния мембран митохондрий, выделенных из 7-дневных эпикотилей проростков гороха, по сравнению с нативными растениями. В присутствии ТНКЖ-тио 10^{-8} М наблюдался сдвиг всех термоиндуцированных переходов в область более низких температур, что может быть следствием умеренного разобщения в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, приводящей к нагреву системы и увеличению локальной температуры. А также уменьшалась микровязкость жидкокристаллического состояния липидных областей мембран митохондрий. Это, вероятно, связано с высвободившимся из ТНКЖ-тио оксидом азота (II), что приводило к увеличению общего содержания всех длинных ненасыщенных жирных кислот (НЖК) C_{20} . Накопление НЖК означает, что в липидных областях мембран оксид азота проявлял антиоксидантные свойства. Было показано уменьшение линолевой кислоты 18:2, входящей в состав кардиолипина - белка, который локализуется в основном возле белков дыхательной цепи, что связано с уменьшением кристалличности при белковых областях мембран митохондрий и сдвигом низкотемпературного термоиндуцированного перехода в область более низких температур. Уменьшение количества линолевой кислоты могло быть результатом взаимодействия NO с супероксид-анион радикалом с образованием пероксинитрита и дальнейшим иницированием пероксидного окисления липидов при белковых областях мембран. Кроме того, линолевая кислота является субстратом в процессах окисления, участвуя в процессах разобщения, диссипации энергии и выделения тепла, что могло привести к увеличению эффективной температуры ближайшего окружения митохондрий и стать причиной уменьшения содержания линолевой кислоты и сдвига структурных переходов в низкие температуры.

Показано, что ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} М может приводить к деструкции липидной фазы мембран митохондрий, вплоть до разрушения мембран. Одним из объяснений этому может быть участие NO в пероксидном окислении липидов и проявление прооксидантных свойств молекулой. Большая концентрация 10^{-4} М ТНКЖ-тио сдвигала низкотемпературные термоиндуцированные структурные переходы обеих фаз мембран в область более низких температур сильнее, чем доза 10^{-8} М, за пределы исследуемого интервала, и в при белковых областях мембран жидкокристаллическому состоянию соответствовал температурный интервал от

10°C до 21°C (294–300 K). Таким образом, обработка митохондрий натрий-μ2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидратом в дозе 10⁻⁴ М, по-видимому, приводила к значительному увеличению уровня пероксидного окисления липидов и текучести липидной фазы мембран.

Эффект никеля и никель-гистидиновых комплексов на ростовые процессы у высших растений

**Герман А. Д.^А, Арзамазкина К. И.^А, Губаревич К. И.^А, Гордых С. А.^А,
Мацкевич В. С.^{А*}**

*^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: mackievic@bsu.by*

Никель является пятым по распространенности элементом на Земле после железа, кислорода, кремния и магния и составляет 3% массы планеты [1]. Никель и его соединения естественным образом присутствуют в земной коре и в относительно больших количествах выбрасываются в атмосферу при извержении вулканов, лесных пожарах, образовании метеорной пыли и т.д. [1-3]. Кроме того, данный металл широко используется в промышленности при производстве нержавеющей стали, различных сплавов, аккумуляторов, элементов электротехники, медицинского и химического оборудования [2]. Поэтому в индустриально развитых регионах часто возникает проблема никелевого загрязнения.

Для растений никель является важным микроэлементом, в первую очередь он входит в состав фермента уреазы [3]. Тем не менее, потребность растений в нем не высока, для большинства видов концентрации Ni²⁺ свыше 10-50 мкМ вызывают токсические эффекты: тормозят ростовых процессов, подавляют фотосинтез, прорастание семян, транспорт сахара и индуцируют хлороз, некроз и увядание [4]. Ni²⁺ способен накапливаться в различных тканях растения, что дает возможность попаданию больших доз никеля по пищевым цепям в организмы животных и человека.

Первичный и наиболее общий ответ растений на воздействие стресс-факторов среды – ингибирование ростовых процессов, происходящих вследствие переключения с использования ресурсов (энергии и метаболических предшественников) для накопления биомассы на использование их для активации защитных механизмов [5]. При этом основной мишенью большинства абиотических стрессоров выступают клетки корня. В связи с этим, анализ роста корней является одним из удобных и информативных методов изучения влияния стресс-факторов на растительный организм, а

также определения стрессоустойчивости различных видов и сортов. Целью настоящей работы являлся анализ влияния никеля и комплексов никеля с гистидином на рост корней важнейших сельскохозяйственных культур: пшеницы, ячменя, подсолнечника и гороха.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовались растения *Triticum aestivum* L. сорт Элегия, *Hordeum vulgare* L. сорт Буслик, *Helianthus annuus* L. гибрид Ореон, *Pisum sativum* L. сорт Виктор. Проростки растения выращивались рулонным методом. Семена ячменя стерилизовались 10% раствором гипохлорита натрия (Белизна) на протяжении 10 мин, промывались под проточной водой и выкладывались на лист фильтровальной бумаги на расстоянии примерно 1 см от верхнего края, затем сверху размещался еще один лист, и все они вместе с семенами скручивались в рулоны, которые помещались в стаканы с питательной средой, содержащей 10% стандартный набор солей Мурасиге и Скуга. В данную среду вводились растворы Ni^{2+} ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и Ni-гистидин, pH доводился до 6,0. Затем стаканы с рулонами ставились в ростовую камеру с поддерживаемым освещением (16 ч свет, 8 ч темнота) и температурным режимом (22°C). На 7 сут регистрировалась длина основного корня, расчеты производились при помощи приложения ImageJ. Общую жизнеспособность клеток корня оценивали при помощи Evans Blue [6]: после обработки стресс-растворами проростки выдерживались 30 мин в 0,025% растворе ЕВ, затем 10 мин промывались в буфере (мМ): 0,1 KCl, 0,1 CaCl_2 , 1 Tris/ 2 Mes pH 6,0; накопление флуоресценцию ЕВ регистрировали на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (фильтр G-2A); изображения анализировались в приложении ImageJ. Анализ продукции гидроксильных радикалов осуществлялся методом спектрометрии электронно парамагнитного резонанса. В качестве спиновой ловушки добавляли ДМПО (5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид) в концентрации 100 ммоль/л. Сигнал ДМПО-НО $\cdot$ регистрировался при помощи ЭПР-спектрометра SpinscanX и анализировался в программе eSpinoza (ADANI).

Ростовые тесты показали, что низкие концентрации Ni^{2+} (до 0,01 мМ) стимулировали рост основного корня пшеницы, однако при увеличении концентрации свыше 0,03 мМ Ni^{2+} наблюдалось ингибирование ростовых процессов. Полунгибирующий эффект отмечался при 0,3 мМ Ni^{2+} , концентрация 10 мМ Ni^{2+} была летальной. В присутствии гистидина токсический эффект Ni^{2+} снижался и даже при летальной концентрации никеля в 10 мМ наблюдалось прорастание семян. Рост корней ячменя ингибировался, начиная с концентрации 0,01 мМ Ni^{2+} (снижение роста на 30), при 10 мМ Ni^{2+} рост корней полностью подавлялся. Добавление гистидина, в соотношении 1 Ni^{2+} :2 гистидин, оказывало протекторное влияние, особенно заметное при 3 и 10 мМ Ni^{2+} (ингибирующий эффект снижался на 20-30%).

В случае подсолнечника при выращивании растений в среде с никелем не наблюдалась стимуляция роста низкими концентрациями Ni^{2+} . Начиная с 0,1 мМ Ni^{2+} отмечалось достоверное ингибирование роста основного корня. Полумаксимальный ингибирующий эффект регистрировался при 0,3 мМ Ni^{2+} , концентрация 10 мМ Ni^{2+} была летальной. Добавление гистидина также оказывало протекторное действие, особенно заметное на фоне сублетальных и летальных уровней никеля. Проростки гороха были более устойчивыми к обработке никелем. Концентрация 0,1 мМ стимулировала ростовые процессы на 20%, начиная с 0,3 мМ Ni^{2+} отмечалось снижение скорости роста основного корня. Полумаксимальный ингибирующий эффект регистрировался при 1 мМ Ni^{2+} , небольшой рост отмечался и на фоне 10 мМ Ni^{2+} . Вероятно, меньшая чувствительность гороха к никелю связана с большой активностью уреазы в бобовых и, следовательно, высокой потребностью растений в никеле, входящим в состав данного фермента. Введение гистидина в питательную среду имело меньший эффект по сравнению с другими видами, небольшое протекторное действие гистидина наблюдалось лишь при 3 и 10 мМ Ni^{2+} .

При помощи эпифлуоресцентной микроскопии и зонда Evans Blue было показано, что 15 ч обработка 1-10 мМ Ni^{2+} вызывает гибель клеток корня высших растений, при этом зона деления является более чувствительной по сравнению с зоной всасывания. В случае ячменя и пшеницы при 10 мМ Ni^{2+} уровень повреждения корня в зоне деления возрастал в 3,4, а в зоне всасывания – в 2,5 раза по сравнению с контролем. В случае подсолнечника – в 3 раза для обеих зон. В случае гороха жизнеспособность клеток снижалась в зоне деления в 3,1, а в зоне всасывания – в 2,3 раза. Для всех культур добавление гистидина оказывало протекторное действие.

При помощи ЭПР-спектрометрии было показано, что свободные ионы никеля не оказывали влияния на сигнал ДМПО-НО $\cdot$ в отличие от комплексов никеля с гистидином. При этом сигнал аддукта ДМПО-НО $\cdot$, индуцируемый Ni-гистидин с добавлением H_2O_2 , был как минимум в десять раз ниже, чем сигнал, генерируемый Cu^{2+} и H_2O_2 . Вероятно, генерация небольшого количества АФК играет важную роль для запуска адаптивных реакций.

Таким образом, было показано, что Ni^{2+} снижает жизнеспособность клеток корня и оказывает ингибиторное действие на ростовые процессы растений. Горох демонстрирует большую устойчивость к никелевому стрессу, возможно, из-за высокой важности и обильности Ni-содержащего фермента уреазы у бобовых. Добавление гистидина оказывает протекторное действие на все протестированные морфо-физиологические пара-

метры в условиях никелевого стресса, что, вероятно, обусловлено его способностью хелатировать Ni^{2+} , а также редокс-активностью образующихся комплексов, которые могут индуцировать синтез АФК и запускать адаптивные реакции в клетках растений.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б24-060) и ГПНИ (№ ГР 20241163)

Библиографические ссылки

1. Мацкевич, В. С. Механизм трансмембранного и дальнего транспорта никеля в высших растениях / В. С. Мацкевич, В. В. Демидчик // Экспериментальная биология и биотехнология. – 2023. – №. 2. – С. 4–29.

2. Серегин И.В., Кожевникова А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения / И.В. Серегин, А.Д. Кожевникова // Физиология растений. – 2006. – Т 53. – С. 285–308.

3. Yaadav N. An account of nickel requirement, toxicity and oxidative stress in plants / N. Yaadav, S. Sharma // Biological forum – an international journal. – 2016. – Vol. 1, № 8. – P. 414–419.

4. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants / T.V.M. Sreekanth [et al.] // Int. J. Environ. Sci. Technol. – 2013. – Vol. 10. – P. 1129–1140.

5. Mechanisms of salinity tolerance / R. Munns, M. Tester // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – Vol. 59. – P. 651–681.

6. Ингибирование ростовых процессов и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля и никель-гистиридиновых комплексов / В.С. Мацкевич и др. // Экспериментальная биология и биотехнология – 2020. – Т. 1. – С. 11-19.

Мелатонин регулирует окислительный и антиоксидантный статус клеточных культур растений *in vitro*

Головацкая И. Ф.^{А*}, Кадырбаев М. К.^А, Бойко Е. В.^А, Лаптев Н. И.^А

^А *Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия. *E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru*

Мелатонин (Мел) играет важную роль в регуляции роста и развития растений. Он контролирует органогенез корней и побегов и формирование растительных тканей, координирует внутренние ритмы растений с фото-периодами. Мел регулирует прорастание семян, цветение, старение и стрессовые реакции растений в ответ на биотические и абиотические факторы. Важной функцией этого индоламина является регуляция окислительного статуса через изменения уровня вторичных метаболитов. Одной из важных и многочисленных групп фенольных соединений (ФС) служит группа флавоноидов (Фл).

Фл выполняют экологическую функцию, защищая растения от УФ-излучения и света высокой интенсивности, патогенов, осуществляют биологическую коммуникацию в ризосфере, регуляцию транспорта ИУК и его метаболизма, повышают эффективность извлечения питательных веществ во время старения растения, реализуют антиоксидантную функцию. Фл могут играть роль при адаптации отдельных клеток к среде при их культивировании *in vitro*, обеспечивая устойчивую пролиферацию клеток.

Несмотря на повышенное внимание к мелатонину, как гормону сна человека, и важного антиоксиданта в растениях, мало сведений о роли Мел в регуляции роста и метаболизма клеточных культур растений. В связи с этим целью нашего исследования было изучение окислительного статуса и уровня ФС и Фл в клеточных культурах лихниса хальцедонского.

Объект и методика исследований. Объектами служили две культуры, полученные от корневого экспланта проростков *Lychnis chalcidonica* L. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) определяли по ТБК-активным продуктам – малоновому диальдегиду (МДА) [1]. Содержание свободного пролина определяли по реакции с нингидрином в кислой среде [2]. Определение суммарного содержания ФС и Фл осуществляли методом спектрофотометрии [3, 4]. Количественное определение индивидуальных Фл проводили методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity с детектором на диодной матрице DAD (Agilent Technologies Inc., США, SHIMADZU, Япония) [5].

Результаты. В ходе эксперимента отметили, что добавление низких концентраций 0,1 нМ Мел в питательную МС-среду увеличивало скорость роста как каллусной, так и суспензионной культуры лихниса хальцедонского. На 28 сутки индекс роста каллусной культуры увеличивался на 25%, что сопровождалось повышением на 88% уровня осмотически активного вещества – пролина. Увеличение окислительного статуса на 17% происходило в ходе активного роста этиолированной культуры, что возможно связано с активацией дыхания. Подобное изменение ТБК-активных продуктов сопровождалось незначительным увеличением суммарного содержания ФС, но существенным снижением на 33% суммарного содержания Фл (табл. 1). Другими Мел-зависимыми высокомолекулярными антиоксидантами служили ферменты супероксиддисмутаза и каталаза [6].

Таблица 1

Влияние мелатонина (Мел) на ростовые параметры и содержание МДА, пролина, фенольных соединений (ФС), флавоноидов (Фл) каллусной клеточной культуры *L. chalconica* на 28 сутки субкультивирования

Вариант	Индекс роста	Содержание, мкмоль/г сырой массы		Содержание, мг/г сухой массы	
		МДА*100	Пролин	ФС	Фл
Контроль	6,75	0,6±0,00	3,02±0,29	9,70±0,16	0,58±0,03
0,1 нМ Мел	8,47	0,7±0,02	5,69±0,15	10,38±0,15	0,39±0,01

Перевод каллусной культуры в суспензионную культуру ускоряло доступ питательных веществ клеткам, что в свою очередь увеличивало прирост биомассы культуры на 20 сутки в 6 раз, тогда как добавление 0,1 нМ Мел в жидкую МС-среду повышало эффективность роста культуры в 12 раз. Осажденный объем из 10 мл суспензии за 10 минут также повышался при действии Мел (табл. 2). Снижение содержания свободного пролина под влиянием Мел могло быть обусловлено его вовлечением в белковый обмен в ходе роста.

Таблица 2

Влияние мелатонина на ростовые параметры и содержание ТБК-активных продуктов (МДА), пролина и фенольных соединений (ФС) суспензионной клеточной культуры *L. chalconica* на 20 сутки субкультивирования

Вариант	Осажденный объем, мл	Сырая масса, г	Сухая масса, г	Содержание, мкмоль/г сырой массы		Содержание ФС, мг/г сухой массы
				МДА*100	Пролин	
Контроль нулевой	1,07 ± 0,01	4,00	-	-	-	-
Контроль 20 суток	1,53±0,01	24,22	1,06	0,78±0,02	3,51±0,27	11,4±0,6
0,1 нМ Мел	1,77±0,02	47,98*	1,81*	0,65±0,03	2,08±0,23	9,7±0,1*

Снижение суммарного содержания Фл было сопряжено с изменением уровня индивидуальных Фл (табл. 3). Получены данные по уровню индивидуальных Фл: дигидрокверцетина, кверцетина и рутина. Эти представители Фл стоят в одном ряду биосинтеза (рис. 1). Содержание рутина и дигидрокверцетина сохранялось на одном уровне как у каллусной, так и суспензионной культуры. В тоже время у активно растущей суспензионной культуры уровень наиболее активного Фл – кверцетина – снижался. Подобные изменения происходили и у каллусной культуры под влиянием Мел. Следовало ожидать, что Мел влиял на активность ферментов, участ-

вующих в преобразовании Фл. В более ранних исследованиях нами показано, что кверцетин находился в небольших количествах и в других каллусных культурах, полученных от разных органов-эксплантов лихниса [7].

Таблица 3

Влияние мелатонина (Мел) на содержание индивидуальных флавоноидов клеточных культур *L. chalcidonica*

Тип культуры, возраст	Вариант	Содержание, мкг/г сухой массы			
		Сумма Фл	Рутин	Кверцетин	Дигидрокверцетин
Каллус, 28 сутки	Контроль	580±30	90,3±19,0	21,8±4,6	204,0±42,8
	0,1 нМ Мел	390±10	<0,01	<0,01	96,6±20,3
Суспензия, 20 сутки	Контроль	420±30	62,9±13,2	<0,01	174,7±36,7

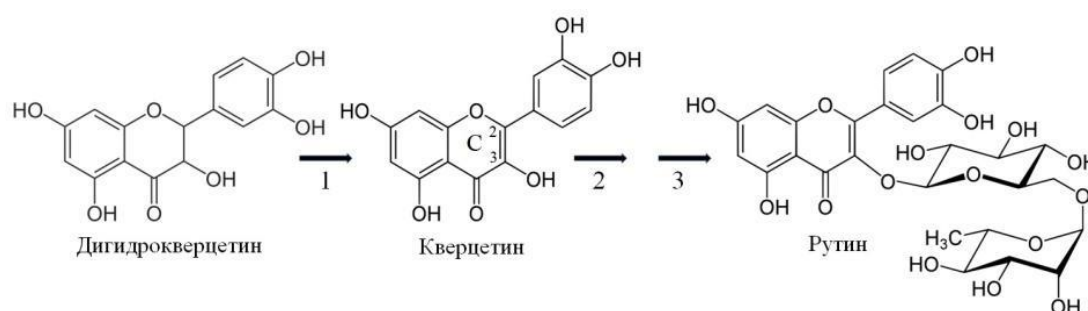


Рис. 1. Схема биосинтеза исследуемых флавоноидов и ферменты их биосинтеза:
1 – флаванолсинтаза; 2 – флавонол 3-О-глюкозилтрансфераза;
3 – флавонол 3-О-глюкозид 6"-О-рамнозилтрансфераза

Таким образом, впервые проведена сравнительная оценка действия мелатонина на индивидуальный состав флавоноидов. Активация роста под влиянием Мел проходила на фоне снижения уровня всех изученных представителей Фл. Наибольшие изменения коснулись рутина и кверцетина. Подобные изменения антиоксидантов поддерживали окислительно-восстановительный статус клеток *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке Программы развития ТГУ (Приоритет 2030).

Библиографические ссылки

1. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // Meth. Enzymol. 1978. V. 52. P. 302. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
2. Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
3. Zagorskina N.V., Dubravina G.A., Alyavina A.K., Goncharuk E.A. Effect of ultraviolet (UV-B) radiation on the formation and localization of phenolic compounds in tea plant

callus cultures // Russ. J. Plant Physiol. 2003. V. 50. P. 270.
<https://doi.org/10.1023/A:1022945819389>

4. Ломбоева С.С., Танхаева Л.М., Оленников Д.Н. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) // Химия растительного сырья. 2008. № 2. С. 65.

5. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига: Зинатне, 1988. 220 с.

6. Golovatskaya I.F., Medvedeva Yu.V., Kadyrbaev M. K., Boyko E.V. Specificity of growth and accumulation of flavonoids in plants and cell cultures of *Lychnis chalconica* obtained from explants of different organs // Russian Journal of Plant Physiology, 2024, Vol. 71. P. 24.

7. Golovatskaya I.F., Kadyrbaev M.K., Boyko E.V. Protective role of melatonin and IAA in the regulation of resistance of potato regenerants to cold stress // Potato Research. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11540-023-09642-8>

Кооперативное взаимодействие компонентов антиоксидантной системы и механизмы контроля генерации активных форм кислорода в жизненном цикле зимующих листьев травянистых растений (на примере *Ajuga reptans* L.)

**Головко Т. К.^{A*}, Силина Е. В.^A, Захожий И. Г.^A, Шелякин М. А.^A,
Дымова О. В.^A**

^A Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия,

^{*}E-mail: golovko@ib.komisc.ru

Формирование и функционирование фотосинтетического аппарата (ФСА) находятся под общим контролем растительного организма и постоянно меняющихся условий среды. В сезонном климате умеренного пояса влияние внешних факторов на состояние ФСА наиболее значимо для зимне-зеленых растений. Целью работы было изучение функционирования механизмов антиоксидантной защиты в жизненном цикле листьев *Ajuga reptans* L. и их роли в сохранении фотосинтетического аппарата во время перезимовки растений.

Объект и методы исследования. *Ajuga reptans* L. (живучка ползучая) – длительно вегетирующий летне-зимне-зеленый травянистый многолетник сем. Lamiaceae. В подзоне средней тайги европейского Северо-Востока России активная жизнедеятельность *A. reptans* начинается в середине мая. После схода снежного покрова растения появляются с перезимовавшими, способными фотосинтезировать розеточными листьями, которые в июне завершают свой жизненный цикл и сменяются новой генерацией. Образцы листьев отбирали в летний период (июль), до и во время перезимовки (сентябрь и декабрь), после перезимовки (конец апреля, май,

начало июня). Активность перекисного окисления липидов оценивали по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП). Содержание пероксида водорода (H_2O_2) измеряли хемилюминесцентным методом с помощью хемилюминометра собственной конструкции. Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли по способности фермента подавлять фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия, аскорбатпероксидазы (APX) – по окислению аскорбата, каталазы (CAT) – по количеству разложившегося H_2O_2 за единицу времени. Для определения изоферментного состава SOD, APX и CAT применяли метод нативного электрофореза в полиакриламидном геле. Содержание растворимого белка анализировали по Bradford. Содержание фотосинтетических пигментов измеряли спектрофотометрически в ацетоновой вытяжке, разделение индивидуальных каротиноидов проводили с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой. Определяли содержание пигментов виолаксантинового цикла (ВКЦ) и рассчитывали степень их деэпоксидации (DEPS). Концентрацию внепластидных пигментов антоцианов измеряли рН-дифференциальным методом и выражали в эквивалентах цианидин-3,5-дигликозида. Скорость дыхания листьев определяли по поглощению O_2 при 20 °С полярографически, активность дыхательных путей оценивали с помощью специфических ингибиторов. Состояние и фотохимическую эффективность ФСII характеризовали по показателям флуоресценции хлорофилла. Более подробное описание методов исследования приведено в работах [1-3].

Активные формы кислорода (АФК) образуются в различных клеточных органеллах и компартментах, преимущественно в ЭТЦ хлоропластов и митохондриях. Нарушение АФК гомеостаза приводит к развитию окислительного стресса. Зрелые розеточные листья *A. reptans* летом (июль) характеризовались сравнительно низким уровнем липопероксидации и содержания H_2O_2 (таблица). Заметное накопление ТБК-РП и H_2O_2 отмечали в период перезимовки (декабрь) и особенно ранней весной после выхода растений из-под снега (апрель-май). Содержание АФК в клетках контролируется антиоксидантными ферментами и низкомолекулярными антиоксидантами. Повышенная активность SOD наблюдалась с сентября по апрель, когда растения испытывали действие низких температур. SOD нейтрализует супероксид-анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$) в реакции дисмутации до O_2 и H_2O_2 и контролирует таким образом концентрацию $O_2^{\cdot-}$, являющегося субстратом образования наиболее агрессивной формы АФК – гидроксильного радикала. Нами обнаружено пять изоформ SOD (Mn-SOD, Fe-SOD и три Cu/Zn-SOD). Причем, появление третьей изоформы Cu/Zn-SOD было отмечено в зимне-весенний период. Хотя увеличение уровня общей активности SOD в этот период было обусловлено повышением активности всех

обнаруженных типов SOD, основной вклад вносили Cu/Zn-содержащие изоформы. APX и CAT являются ферментами, нейтрализующими H_2O_2 в клетках растений. APX присутствует в строме и тилакоидной мембране хлоропластов, а также в пероксисомах и цитоплазме. Увеличение активности APX отмечали в весенний период (апрель), когда содержание H_2O_2 было максимальным. Идентифицированы две изоформы APX, причем основной вклад в общую активность фермента вносила более подвижная, вероятно, цитозольная изоформа. Активность CAT была высокой в листьях при подготовке и во время перезимовки. Значительное повышение уровня ее активности отмечали у стареющих листьев на фоне уменьшения содержания H_2O_2 . Этот фермент локализован преимущественно в пероксисомах, но обнаружен также в цитозоли и митохондриях. В листьях *A. reptans* CAT была представлена только одной изоформой, вероятно, пероксисомальной. Выявленные нами различия в динамике активности APX и CAT, по-видимому, связаны с разным сродством ферментов к H_2O_2 . H_2O_2 является наиболее стабильной формой активированного кислорода, что обусловлено его низкой реакционной способностью и отсутствием заряда. Следует отметить, что молекулы H_2O_2 выполняют важную функцию внутриклеточного мессенджера и участвуют в сигналинге. Полученные данные свидетельствуют об адаптивном характере изменения активности ферментов, контролирующих генерацию АФК и накопление H_2O_2 .

Таблица 1

Динамика изменения показателей про-/антиоксидантного метаболизма листьев *Ajuga reptans*

Месяц	ТБК-РП	H_2O_2	SOD	APX	CAT
VII	4.9 ± 0.6^{abc}	0.44 ± 0.02^{ab}	1.8 ± 0.1^b	1.3 ± 0.2^a	18.2 ± 0.4^b
IX	4.5 ± 0.2^{ac}	0.35 ± 0.08^a	4.8 ± 0.4^a	1.8 ± 0.1^{bc}	27.8 ± 1.9^a
XII	6.2 ± 0.1^{ab}	0.56 ± 0.04^{ab}	4.9 ± 0.1^a	1.4 ± 0.1^{ab}	28.6 ± 3.1^a
IV*	6.7 ± 0.8^b	1.04 ± 0.01^d	4.6 ± 0.2^a	3.2 ± 0.4^d	16.8 ± 2.8^b
V*	6.3 ± 0.2^{ab}	0.61 ± 0.01^e	3.4 ± 0.1^d	2.0 ± 0.4^c	17.9 ± 1.2^b
VI*	5.8 ± 0.3^{abc}	0.05 ± 0.01^c	2.2 ± 0.1^b	1.6 ± 0.2^{abc}	27.1 ± 0.1^a

Примечание: содержание ТБК-РП и H_2O_2 выражали в мкмоль/г сырой массы, активность SOD – в ед/мг белка, APX – в мкмоль аскорбата/мг белка мин, CAT – в мкмоль H_2O_2 /мг белка мин. Символом «*» отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение года (ANOVA, критерий Дункана, $n = 8-9$, $P \leq 0.05$).

Листья *A. reptans* в процессе перезимовки необратимо теряли фотосинтетические пигменты и, в первую очередь, хлорофилл (Хл). Содержание Хл в появившихся из-под снега растениях было вдвое меньше, чем осенью до перезимовки, что обусловлено распадом крупных пигмент-белковых комплексов фотосистем (мегакомплекса ФСІ-ФСІІ и суперкомплекса ФСІІ-ССКІІ) [4]. Уменьшение фонда зеленых пигментов и распад

пигмент-белковых комплексов можно рассматривать как защитную реакцию растений, направленную на снижение поглощения света и предотвращение избыточной генерации АФК. Каротиноиды, известные своей способностью обезвреживать активные радикалы, подвергались меньшему, по сравнению с Хл, разрушению.

Особую роль в защите ФСА играют каротиноиды ВКЦ, функционирующего в ФСII хлоропластов. Освещение хлоропласта активирует фермент виолаксантиндеэпоксидазу, осуществляющую превращение виолаксантина в зеаксантин. Протонирование и связывание с ФСII белка PsbS, локализованного во внутритилакоидном пространстве, приводит к образованию комплекса, в котором энергия возбуждения Хл эффективно передается на зеаксантин и безопасно рассеивается в форме тепла. Сброс энергии наблюдается не только на интенсивном свете, но и при действии разного рода стрессов, подавляющих ассимиляцию CO_2 . Устойчиво высокий уровень деэпоксидации пигментов ВКЦ листьев *A. reptans* был отмечен в период, когда низкие температуры ингибировали процессы фотосинтетического восстановления углерода [1].

Перезимовка приводила к накоплению антоцианов (АЦ) – внепластидных пигментов флавоноидной природы. Максимум содержания АЦ (0.9 мг/г сухой массы) отмечали после выхода растений из-под снега на фоне низкого содержания Хл. АЦ могут экранировать ФСА от воздействия сильного светового потока и выполнять функцию низкомолекулярных антиоксидантов, нейтрализующих АФК при фотоокислительном стрессе [5].

Предотвращение чрезмерного образования АФК в митохондриях связано с вовлечением альтернативного пути транспорта электронов (АП) [2]. Повышение способности листьев *A. reptans* к дыханию по энергетически малоэффективному АП отмечали поздней осенью и в зимний период. Ранней весной, после появления растений из-под снега активность АП дыхания в листьях снижалась на фоне усиления дыхания по цитохромному пути (ЦП). Это обусловлено потребностью клеток в АТФ для восстановления структурно-функциональной организации ФСА и возобновления ассимиляции CO_2 в перезимовавших листьях. В июне, на завершающих этапах жизненного цикла листьев отмечали падение активности ЦП, тогда как способность АП практически не изменялась, что приводило к уменьшению соотношения ЦП/АП. Кроме того, увеличивался вклад остаточного дыхания, которое связывают с окислением органических соединений различными оксидазами и оксидоредуктазами в пероксисомах и на эндоплазматическом ретикулуме. Вероятно, АП и остаточное дыхание способствуют снижению концентрации O_2 и образования АФК в клетках мезофилла стареющих листьев, что позволяет поддерживать их метаболизм и

обеспечить более полную реутилизацию органических веществ и минеральных элементов для формирующихся листьев новой генерации.

Нами установлено, что перезимовка растений *A. reptans* приводила к необратимой потере фотосинтетических пигментов, накоплению антоцианов, транзиторному изменению энергетической эффективности дыхания и тепловых потерь поглощенной пигментами световой энергии. Изменения содержания низкомолекулярных антиоксидантов, активности антиоксидантных ферментов, альтернативного дыхательного пути и виолаксантинового цикла носили адаптивный характер, что способствовало снижению уровня окислительного стресса и сохранению ФСА. Новые данные указывают на кооперативное взаимодействие компонентов антиоксидантной системы и механизмов контроля генерации АФК в листьях зимне-зеленых травянистых растений.

Работа выполнена по теме НИР № 122040600021-4 за счет средств федерального бюджета

Библиографические ссылки

1. Dymova O. V., Zakhozhiy I. G., Golovko T. K. Age and Adaptive Changes in the Photosynthetic Apparatus of Leaves in Winter Green Herbaceous Plant *Ajuga reptans* L. in the Natural Conditions of the Taiga Zone// Russ. J. Plant Physiol., 2023, vol. 70, p.114. DOI: 10.1134/S1021443723601325

2. Shelyakin M. A., Silina E. V., Golovko T. K. Age and Adaptive Changes in Pro-/Antioxidant Metabolism Indicators and Respiration of the Winter-Green Herbaceous Plant *Ajuga reptans* L. Leaves in Natural Conditions of the Taiga Zone // Russ. J. Plant Physiol., 2024, vol. 71, p.31.

DOI: 10.1134/S1021443724604397

3. Malyshev R. V., Silina E. V. Luminometer: Principle of Operation, Device, and Recommendations for Assembly // Instrum. Exp. Tech., 2023, vol. 66, p. 476. DOI: 10.1134/s0020441223020203

4. Dymova O., Khrystin M., Misalski Z., Kornas A., Strzalka K., Golovko T. Seasonal Variations of Leaf Chlorophyll–protein Complexes in the Wintergreen Herbaceous Plant *Ajuga reptans* L. // Func. Plant Biology, 2018, vol. 45, p.519. DOI: 10.1071/FP17199

5. Golovko T.K. Plant Anthocyanins: Structure, Biosynthesis Regulation, Functions, and Ecology// Russ. J. Plant Physiol., 2023, vol. 70, 161. DOI: 10.1134/S1021443723700292

Ответ антиоксидантной системы растений подсолнечника на применение комбинаций биопрепаратов при их росте на нефтезагрязненной земле

**Григориади А. С.^А, Федяев В. В.^А, Сотникова Ю. М.^А,
Морозова А. А.^А, Фархутдинов Р. Г.^А**

^А Уфимский университет науки и технологий, кафедра биохимии и биотехнологии,
Уфа, Россия

Известно, что применение микробных препаратов на основе разных видов микроорганизмов, может повышать устойчивость растений, стимулировать рост в неблагоприятных условиях, за счет синтеза ими фитогормонов (ауксинов и цитокининов) (Архипова и др., 2006; Бакаева и др., 2021). Следовательно, при оценке эффективности микробиологических препаратов, предназначенных для биodeградации нефтепродуктов, необходимо изучать комплекс анатомических и физиологических параметров растений-ремедиантов, который будет свидетельствовать о наличии или отсутствии микробно-растительного взаимодействия (Пинчук и др., 2018). Ранее нами была проведена оценка изменений морфометрических показателей, содержания фитогормонов и особенностей морфологии корней растений ржи посевной в условиях нефтяного загрязнения серой лесной почвы (Sotnikova et al., 2023), которая показала на различный характер влияния микробных препаратов и их комбинаций на ростовые показатели и состояние антиоксидантной системы. Учет данных показателей необходим для формирования технологии применения биопрепаратов и растений ремедиантов (Сотникова, Григориади, Фархутдинов, 2022). Целью настоящей работы стало определение ответа антиоксидантной системы растений подсолнечника на применение комбинаций биопрепаратов при их росте на нефтезагрязненной земле.

В качестве объектов исследования были выбраны сорта подсолнечника однолетнего (*Helianthus ánnuus*, сорт Бомбардир). Растения выращивали с применением универсальной опоры, которая позволяла поддерживать растения в вертикальном состоянии (Федяев и др. 2021).

Лабораторные модельные опыты проводили на черноземах, в месте отбора проб почвы, мощность гумусового горизонта 55-60 см и содержанием гумуса 8-9 % тёмно-серой окраски, структура пылевато-зернистая или комковато-крупнозернистая, присутствуют карбонаты, механический состав тяжелосуглинистый и глинистый, реакция слабокислая (рН 6,2-6,5).

В почву вносили товарную нефть в концентрации 4% от сухой массы почвы (Сотникова и др., 2021). После распределения поллютанта в почве,

в неё вносили биопрепарат «Ленойл» в виде суспензии с титром $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в 1 мл), из расчета 0,3 мл на 100 г сухой почвы. Спустя 30 суток биodeградации нефти, содержащейся в почве с помощью биопрепарата «Ленойл», в часть добавляли препараты (Азолен или Агробиолог или Новый) в виде суспензии с титром $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в 1 мл), из расчета 0,3 мл на 100 г сухой почвы. В почву вносили семена исследуемых растений в соответствии с рекомендациями для каждой культуры с учетом требований ГОСТ Р ИСО 18769-2019 и ГОСТ Р ИСО 22030-2009. В контрольном варианте эксперимента растения выращивали без внесения нефти. Сравнительную оценку влияния устойчивости проводили через 30 суток. Растения в течение 30 дней выращивали в сосудах объемом 0,5 л, при 14-часовом светопериоде, интенсивности освещения 30 клк и температуре воздуха 22-25 °С.

В состав биопрепарата «Ленойл»® – NORD, СХП (производитель ЗАО НПП «Биомедхим» ТУ 9291-007-33822935-2014) входят бактерии *Pseudomonas turukhanskensis* ИБ 1.1 (Логинов и др., 2009). Этот биопрепарат предназначен для биологической обработки нефтезагрязненных почв, грунтов, водных поверхностей с целью ускорения биоразложения нефти, восстановления продуктивности рекультивируемых почв. «Азолен» - микробиологическое удобрения (*Azotobacter vinelandii* ИБ 4-8* 10^9 КОЕ/мл) с фунгицидными ростостимулирующими свойствами и азотофиксирующей способностью. Нейтрализатор пестицидного стресса «Агробиолог» представляет собой живые бактерии *Pseudomonas protegens* DA1.2 ($45 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), рекомендуется для повышения устойчивости растений к гербицидному воздействию, засухе, способностью к фиксации атмосферного азота, минерализации фосфора. Препарат под условным названием «Новый» (разработка Уфимского ИБ УФИЦ РАН), представляет собой штамм BLK - стимулятор роста кормовых трав, на начальных этапах исследования было выявлено, что штамм BLK, по данным разработчиков, положительно влияет на всхожесть, массу побегов и корней у кормовых трав, имеет определенную нитрогеназную и фосфатмобилизующую активность.

Активность гваяколпероксидазы рассчитывали по методике А.И. Ермакова (1987). Активность каталазы оценивали по методу М.А. Королук (1988).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0, рассчитывали средние значения, стандартные отклонения и доверительный интервал при $P \leq 0,05$.

Известно, что неблагоприятные условия усиливают создание активных форм кислорода (АФК). АФК могут выступать в качестве вторичных мессенджеров, участвующих в пути передачи сигнала стресса, но их чрезмерная продукция может вызывать окислительный стресс, который повреждает растения, окисляя фотосинтетические пигменты, мембранные липиды, белки и нуклеиновые кислоты. Для контроля за уровнем АФК, растения имеют неферментативные и ферментативные антиоксидантные системы для защиты клеток от окислительного повреждения [Колупаев и др., 2012; Mattos and Moretti, 2015]. Кроме того, растения способны выполнять ферментативную деградацию органических поллютантов путем специфических для растительных клеток метаболических превращений и важную роль в этом играет - пероксидаза [Kvesitadze et al., 2009]. Это может быть связано с тем, что пероксидазы в компонентах растительной клетки очень распространены, имеют низкую субстратную специфичность, сродство к ксенобиотикам разной химической структуры и т.д. [Kvesitadze et al., 2009]. Таким образом, пероксидаза в условиях загрязнения принимают участие в защите растений от окислительного стресса и могут участвовать в деградации органических поллютантов, попадающих внутрь растения. В связи с этим нами детектировалась активность внутриклеточных пероксидаз в побегах и корнях подсолнечника.

Как видно из таблицы 1 применение на контрольных вариантах различных комбинаций микробиологических препаратов из препарата нефтеструктора «Ленойл» и стимуляторов роста «Азолен», «Агробиолог» и биопрепарата под условным названием «Новый», показало, что достоверное повышение активности фермента пероксидазы было в варианте «Ленойл+Агробиолог» и «Ленойл+Азолен» в корнях, по сравнению с «чистым» контролем. В надземной части стимулирующими активность фермента были комбинации «Ленойл+Агробиолог» и «Ленойл+Азолен+Новый». Другие комбинации препаратов снижали активность фермента пероксидазы, относительно контроля. Эти данные позволяют сделать предположение, что микробиологические препараты оказывают влияние разнонаправленное влияние на активность фермента.

Загрязнение черноземной почвы в опытах с подсолнечником приводило к снижению активности пероксидаз в корнях и надземной части подсолнечника. Эта реакция была схожа на установленную нами ранее у ржи и люцерны на серой лесной почве (Сотникова и др, 2021). Применение биопрепаратов на нефтезагрязненных почвах в комбинациях «Ленойл+Новый», «Ленойл+Азолен» и «Ленойл+Агробиолог» приводило к активации фермент каталазы в корнях, а надземной части во всех комбинациях биопрепаратов. Это также говорит в пользу того, что микробиоло-

гические препараты по-разному влияют на активацию фермента АФК системы – каталазу. Наибольшая активация фермента в корнях наблюдалась при применении комбинации «Ленойл+Агробиолог».

Таблица 1

Изменение активности пероксидазы в побегах и корнях растений подсолнечника (сорт Бомбардир), выращенных в почве с содержанием 4% нефти и внесении биопрепаратов «Азолен», «Ленойл», «Агробиолог», «Новый»

Показатель	Корень	Побег
Контроль (почва без нефти)	42,6±4,48	37,76±3,44
Загрязнение (почва с нефтью)	18,11±1,22	22,81±2,48
Контроль+Ленойл+Азолен+Новый	31,22±3,91	53,89±5,45
Контроль+Ленойл+Азолен	49,50±4,1	40,2±4,98
Контроль+Ленойл+Новый	36,99±1,38	38,74±3,02
Контроль+Ленойл	34,22±3,74	24,58±2,54
Контроль+Ленойл+Агробиолог	52,51±2,91	48,58±4,09
Загрязнение+Ленойл+Новый	30,50±3,09	49,36±4,5
Загрязнение+Ленойл+Азолен+Новый	21,81±3,85	40,71±4,87
Загрязнение+Ленойл	14,90±1,29	43,66±2,31
Загрязнение+Ленойл+Азолен	45,43±4,18	52,90±4,59
Загрязнение+Ленойл+Агробиолог	55,85±5,04	46,38±4,79

Определение активности каталазы показало (табл. 2), что применение на контрольных растениях (выросших на почве без внесения нефти, но с применением определенных биопрепаратов) приводило увеличению активности фермента в 2 – 7 раз. Однако, в корнях не происходило изменения активности каталазы и более того происходило снижение его активности при применении препарата «Ленойл». Также, как и при определении активности пероксидаз (табл. 1), нами было установлено снижение активности фермента каталазы, при росте нефтезагрязненной почве происходило снижение внутриклеточной активности фермента каталазы в корнях и отсутствие реакции в надземной части (табл. 2). Это говорит об органоспецифичности работы фермента. Применение микробиологических препаратов приводило к активации фермента каталазы в корнях при комбинациях «Ленойл+Новый», «+Ленойл», «Ленойл+Азолен» и «Ленойл+Агробиолог», но активация практически отсутствовала в комбинации «Ленойл+Азолен+Новый». Величина активации составила от 203 до 268%. В побегах величина была кратно выше от 8.7 до 9,7 раза, за исключением варианта «+Ленойл», где активация составила 35%.

Наибольшая активация фермента каталаза в корнях и надземной части также, как и при определении активности фермента пероксидаза, наблюдалась при применении комбинации препаратов «Ленойл+Агробиолог» (табл. 2). Это говорит, о том, что при таком сочетании препаратов

у растения формируется наиболее высокая активность ферментов принимающих участие в защите растений от окислительного стресса и возможно в деградации органических поллютантов, попадающих внутрь растения.

В условиях нефтяного загрязнения и обработки почвы биопрепаратами деструктором нефти «Ленойл» и стимуляторами роста, нам удалось установить роль антиоксидантной системы растений в адаптации к разрабатываемой технологии применения подсолнечника в качестве фиторемедианта. Определение уровня активности ферментов антиоксидантной системы растений важно для подбора концентраций биопрепаратов и создания их комбинаций при проведении фиторемедиационных мероприятий на почвах, загрязненных нефтью. Применение углеводородокисляющих микроорганизмов р. *Pseudomonas* способных синтезировать гормоны растений, является большим преимуществом для формирования устойчивости растений-фиторемедиантов к их росту в условиях нефтяного загрязнения почвы.

Таблица 2

Изменение активности каталазы в побегах и корнях растений подсолнечника (сорт Бомбардир), выращенных в почве с содержанием 4% нефти и внесении биопрепаратов «Азолен», «Ленойл», «Агробиолог», «Новый»

Показатель	Корень	Побег
Контроль (почва без нефти)	203,76±18,83	75,58±7,08
Загрязнение (почва с нефтью)	72,49±7,36	72,12±8,91
Контроль+Ленойл+Азолен+Новый	217,02±20,8	591,4±54,81
Контроль+Ленойл+Азолен	198,24±20,29	574,16±51,61
Контроль+Ленойл+Новый	198,02±18,57	523,33±52,04
Контроль+Ленойл	82,21±9,67	144,98±14,57
Контроль+Ленойл+Агробиолог	206,86±20,15	261,66±24,1
Загрязнение+Ленойл+Новый	147,63±13,13	655,04±62,03
Загрязнение+Ленойл+Азолен+Новый	96,36±6,15	693,94±28,52
Загрязнение+Ленойл	160,89±15,85	97,68±9,91
Загрязнение+Ленойл+Азолен	148,51±14,25	626,31±27,92
Загрязнение+Ленойл+Агробиолог	194,48±17,02	700,57±25,03

Проведенные исследования показали, также, что при применении биопрепаратов «Ленойл», «Азолен», «Агробиолог» и «Новый» в определенных комбинациях улучшаются ростовые показатели растений подсолнечника и всхожесть семян, изменяется активность ферментов антиоксидантной системы. Так достоверное повышение активности фермента пероксидазы было в варианте «Ленойл+Агробиолог» и «Ленойл+Азолен» в корнях, а в надземной части активность фермента была выше в комбинации «Ленойл+Агробиолог» и «Ленойл+Азолен+Новый». Другие комбинации препаратов снижали активность фермента пероксидазы. Активации

фермента каталазы в корнях наблюдалась при комбинациях «Леннойл+Новый», «+Леннойл», «Леннойл+Азолен» и «Леннойл+Агробиолог». Это говорит о том, что данные композиции биопрепаратов создают благоприятные условия для роста проростков подсолнечника на нефтезагрязненной почве.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00358, <https://rscf.ru/project/23-24-00358/>.

Библиографические ссылки

1. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И., Мартыненко Е.В., Кудоярова Г.Р. Влияние микроорганизмов, продуцирующих цитокинины, на рост растений. Биотехнология. 2006. № 4. С. 50-55.
2. Бакаева М.Д., Коршунова Т.Ю., Столярова Е.А. Влияние микроорганизмов с разным набором свойств на содержание нефтепродуктов в почве и морфометрические показатели растений. Известия Уфимского Научного Центра РАН. 2021. № 2. С. 74–78.
3. Пинчук И.П., Полянская Л.М., Кириллова Н.П., Степанов А.Л. Особенности формирования микробного сообщества дерново-подзолистой почвы в процессе вегетации ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Почвоведение. - 2018. - № 12. - С. 1498-1505.
4. Sotnikova, Y.; Grigoriadi, A.; Fedyaev, V.; Garipova, M.; Galin, I.; Sharipova, G.; Yamaleeva, A.; Chetverikov, S.; Veselov, D.; Kudoyarova, G.; Farkhutdinov R. Influence of a Hydrocarbon Biodestructor on the Growth and Content of Phytohormones in *Secale cereale* L. Plants under Petroleum Pollution of the Soil. Agriculture 2023, 13, 1640. <https://doi.org/10.3390/agriculture13081640>
5. Сотникова Ю.М., Григориади А.С., Фархутдинов Р.Г. Технология фиторемедиации нефтезагрязненных серых лесных почв: монография /, – Уфа: РИЦ БашГУ, 2022. – 160 с.
6. Федяев В.В., Кулуев Б.Р., Сотникова Ю.М., Фархутдинов Р.Г., Хаматдинова Г.И., Гарипова М.И., Веселов С.Ю. Универсальная опора для растений. Патент РФ № 198397, опубликовано 03.07.2020 г. Бюллетень изобретений № 19.
7. Сотникова Ю.М., Федяев В.В., Григориади А.С., Гарипова М.И., Махмутов А.Р., Галин И.Р., Новоселова Е.И., Ямалеева А.А., Фархутдинов Р.Г. Оценка фиторемедиационного потенциала сельскохозяйственных растений при нефтяном загрязнении почвы. "Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки" №3, 2021 С. 99-109. DOI: 10.21685/2307-9150-2021-3-9
8. Королюк, М.А. Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. Лабораторное дело. - 1988. - №1. - С.16-19.
9. Ермаков, А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
10. Логинов О.Н. Силищев Н.Н., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Биорекультивация: микробиологические технологии очистки нефтезагрязненных почв и техногенных отходов - М.: Наука, 2009. - 112 с.
11. Колупаев, Ю.Е. Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигнал у растений. Ukr. Biochem. J. - 2014. - V. 86. - № 4. - Р. 18-35.

12. Mattos L. M., Moretti C. L. oxidative stress in plants under drought conditions and the role of different enzymes. 2015.–Enzyme Engineering, 5: 1.

13. Kvesitadze E., Sadunishvili T., Kvesitadze G. Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants //World Acad Sci Eng Technol. – 2009. – Т. 55. – №. 6. – С. 458-468.

14. Сотникова Ю.М., Федяев В.В., Григориади А.С., Гарипова М.И., Галин И.Р., Габидуллина Г.Ф., Фархутдинов Р.Г. Роль фитогормонов в формировании устойчивости растений-фиторемедиантов в условиях почвенного нефтяного загрязнения на фоне комплексного применения биопрепаратов. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2021. № 4. С. 52- 60.

Редокс-регулируемые K^+ -каналы GORK и анионные каналы ALMT1 вовлечены в отток электролитов из клеток корня *Arabidopsis thaliana*

**Гриусевич П. В.^А, Толкачева Ю. В.^А, Новосельский И. Ю.^А,
Демидчик В. В.^{А*}**

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: dzemidchyk@bsu.by

Отток электролитов из тканей растений – это реакция, наблюдающаяся в ходе стресса, и в ряде процессов нормальной физиологии. Интенсивность и обратимость выхода электролитов рассматривается в качестве генерализованного индикатора устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды [1]. На сегодняшний день природа оттока электролитов остается малоизученной, неясны первичные мембранные механизмы данного явления и не идентифицированы молекулярные мишени, запускающие выход электролитов из клеток. В последние годы показано, что при умеренном стрессе отток электролитов – явление обратимое, то есть регулируемое и не приводящее к гибели клеток растения, что указывает на вероятное вовлечение ион-транспортных систем в данную реакцию. Стресс-индуцированный выход электролитов из растительных клеток практически всегда сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК). Данные явления регистрируются одновременно и практически сразу с момента воздействия стрессоров, приводя к потере K^+ и выходу анионов, а также к активации редокс-зависимых сигнальных процессов [2; 3]. В последние годы также установлено, что генетическое нокаутирование редокс-регулируемого K^+ -канала наружного выпрямления «Guard cell Outward-Rectifying K^+ channel» (GORK) многократно снижает отток K^+ при стрессе [3; 4]. При этом неясно, каким образом активируется данный канал при развитии стрессовой реакции. Исследования на близком GORK канале «Stelar K^+ Outward-Rectifying channel» (SKOR), обеспечивающем загрузку K^+ в ксилему, показали наличие в его структуре уникального

АФК-сенсора, ответственного за рост проводимости в присутствии АФК [5]. Таким образом, АФК, продуцируемые при стрессе, могут напрямую активировать канал. АФК-сенсор представлен у SKOR аминокислотным остатком

Цис.-168 в линкерном участке между 3 и 4 трансмембранными доменами, обеспечивающими потенциал-зависимость гейтинга. В лаборатории физиологии и биотехнологии растений БГУ совместно с Техническим университетом Мадрида была выдвинута гипотеза, согласно которой гомологичная Цис.-168 аминокислота Цис.-151 в комплексе GORK также функционирует как сенсор АФК. Коллегами из Технического университета Мадрида с использованием сайт-специфического мутагенеза были получены трансгенные растения *A. thaliana* с модифицированными АФК-сенсорами (Цис.-151 заменен на редокс-инертный Сер), которые были использованы в настоящей работе. Помимо потока K^+ , важной составляющей оттока электролитов при стрессе является выход из клеток анионов, что необходимо для уравнивания потоков K^+ [1; 2]. У высших растений в анионном составе цитоплазмы и вакуоли доминируют органические анионы, такие как малат, цитрат, сукцинат, аскорбат и др., в отличие от животных, у которых доминирует Cl^- [6]. Пока непонятно, какие ионные каналы и потоки каких анионов обеспечивают анионную составляющую стресс-индуцированного оттока электролитов. Можно предположить, что за выход органических анионов могут отвечать каналы семейства «ALuminum-activated Malate Transporter» (ALMT). Известно, что ALMT1 обеспечивает отток малата из клеток корня *Triticum aestivum* L. в ответ на стресс, вызываемый Al^{3+} [7]. Гипотетически, ALMT1 способен кроме малата транспортировать и другие органические и неорганические анионы. Ген, кодирующий ALMT1, обнаружен во всех известных геномах высших растений. Тем не менее, универсальность ALMT1 в качестве системы выхода различных анионов не подтверждена. В этой связи целью настоящей работы являлось установление роли редокс-регулируемых K^+ -каналов GORK и анионных каналов ALMT в оттоке электролитов из клеток корня *A. thaliana*.

В работе использовались 6-12-дневные проростки *A. thaliana* экотипов Col-0 и WS-0, а также нокаутных линий: *gork1-1*, Компл.*gork1-1*, Сер.-151, *almt1*. Семена различных экотипов *A. thaliana* и трансгенных линий по гену Gork были предоставлены профессором Инго Дреером из Технического университета Мадрида, нокаутная линия *almt1* – профессором Стивенном Таерманом из Университета Аделаиды. *A. thaliana* культивировались в стерильных условиях на среде Мурасиге и Скуга [8]. Гидроксил-генерирующая смесь (ГГС) включала 1 mM Cu^{2+} , 1 mM L-аскорбиновой

кислоты, 1 mM H₂O₂. Протопласты изолировались ферментативно из измельченных корней согласно стандартному протоколу [8]. Регистрация трансмембранных токов осуществлялась при помощи техники пэтч-кламп с использованием ранее разработанных рабочих растворов в конфигурации целая клетка [4].

Анализ выходящих ионных токов у растений *A. thaliana* дикого типа (экотип WS-0) продемонстрировал наличие быстро- и медленно-активирующихся компонент в наружу-направленной проводимости плазматической мембраны. Введение ГГС в наружный раствор приводило к увеличению медленно-активирующейся компоненты выходящего тока и незначительному росту быстро-активирующихся токов во всех протестированных протопластах. Активация ионных токов наблюдалась в течение 15-20 мин с момента начала генерации HO[•] в наружном растворе. Наружу-направленная проводимость снижалась при замене калия на блокатор K⁺-каналов ТЭА⁺ в составе пипеточного раствора. Это указывает на то, что в отток K⁺ при воздействии HO[•] вовлечены ТЭА⁺-чувствительные K⁺-селективные каналы, которые, как было показано ранее, кодируются геном *Gork* и локализованы в плазматической мембране ризодермы [4]. Для установления группы ионных каналов, обеспечивающих отток K⁺ при окислительном стрессе, была проведена серия электрофизиологических тестов на трансгенной линии *gork1-1*, лишенной функционального наружу-выпрямляющего K⁺-канала GORK. Анализ ионных токов через плазматическую мембрану протопластов, выделенных из клеток корня данной линии, в контрольных условиях продемонстрировал наличие только быстрой компоненты тока (отсутствие время-зависимости наружу-направленных токов). Редукция медленной части тока свидетельствует об отсутствии активности GORK, который отличается медленной активацией. Мгновенная компонента тока, обусловленная активацией неселективных катионных каналов, была сопоставима с компонентой GORK. Введение ГГС в наружный раствор не приводило к модификации ионных токов через плазматическую мембрану у *gork1-1*. В работе был проведен анализ проницаемости плазматической мембраны у двух линий растений *A. thaliana* с возвращенным нативным K⁺-каналом GORK. В контрольных условиях у линий Компл.*gork1-1* и растений *A. thaliana* дикого типа регистрировались сходные ионные проводимости. Наружу-направленная проводимость у линий Компл.*gork1-1* в контроле состояла главным образом из быстрой компоненты тока. Время-зависимая компонента не была зарегистрирована. Введение в наружный раствор ГГС приводило к росту наружу-направленной проводимости и появлению медленной (время-зависимой) компоненты тока. Были проанализированы ионные токи через плазматическую мембрану клеток корня *A. thaliana* трех линий Сер.-151, экспрессирующих

наружу-выпрямляющий калиевый канал GORK с замещенным цистеиновым остатком по положению 151 на серин. Замена цистеина на серин приводила к снижению чувствительности GORK к АФК. Воздействие ГГС не приводило к активации наружу-выпрямляющего K^+ -тока при деполяризации плазматической мембраны у линий Сер.-151. В целом, характеристики ионных токов у линий с модифицированными каналами GORK были сходны с линией *A. thaliana gork1-1*.

С использованием техники пэтч-клямп был проведен анализ проницаемости плазматической мембраны клеток корня *A. thaliana* (экотип Col-0) к органическим анионам. При введении в пипеточный раствор 40 мМ малата регистрировались высокие значения отрицательного тока, соответствующего выходу анионов, которые снижались в 5 раз при добавлении блокатора анионных каналов 9-антраценкарбоновой кислоты (9-АЦ). Малатные токи обладали быстрой кинетикой активации, слабой потенциал-зависимостью, что свидетельствует о вероятном вовлечении анионных каналов семейства ALMT в выход малата из клеток корня. Дальнейшие эксперименты были направлены на получение доказательства участия функционального ALMT во внутри-направленной анионной проводимости клеток корня. В качестве гена-кандидата среди Almt был выбран ген Almt1. Это было обусловлено тем, что данный ген обильно экспрессируется в клетках корня высших растений и отвечает за отток малата при Al^{3+} -стрессе у *Triticum aestivum* L. [9]. Были исследованы токи, ответственные за выход малата через плазматическую мембрану клеток корня нокаутной линии *Atalmt1*, лишенной канала ALMT1. У данных растений значения малатного тока были приблизительно в 5 раз ниже по сравнению с растениями дикого типа. Полученные данные указывают на то, что продукты гена Almt1 участвуют в выходе малата из клеток корня *A. thaliana*. Проанализирована проницаемость клеток корня *A. thaliana* к аскорбату. При добавлении в ПР 40 мМ L-аскорбата был зарегистрирован высокий отрицательный ток, который снижался приблизительно в 2 раза при действии 1 мМ 9-АЦ. У линии *A. thaliana*, лишенной канала ALMT1, регистрировался ток аскорбата приблизительно в 3 раза ниже по сравнению с величиной такого же тока у растений дикого типа. Таким образом, было впервые установлено, что ALMT1 обеспечивает транспорт аскорбата из клеток корня *A. thaliana* во внешнюю среду. Ранее данный механизм транспорта аскорбата из клеток корня высших растений не был известен. В ходе анализа проницаемости ALMT к цитрату были выявлены 2 группы протопластов, отличающиеся по селективности к данному аниону. В первой группе клеток (68%) отрицательный ток был ниже приблизительно в 6 раз по сравнению с второй группой (32%). Добавление в пипеточный раствор 1 мМ 9-АЦ

приводило к снижению анионного тока приблизительно в 4,5 раза. Биофизические свойства токов цитрата были сходны с токами малата, что указывает на вероятное участие ALMT1 в выходе цитрата из клеток корня. В растениях *almt1* величина тока цитрата была приблизительно в 7,5 раза ниже, чем у растений дикого типа. Таким образом, полученные данные указывают на высокую вероятность того, что ALMT1 ответственен за отток цитрата из клеток корня *A. thaliana*. Установлено, что плазматическая мембрана клеток корня *A. thaliana* обладает низкой проницаемостью для фумарата, пропионата и глюконата. Зарегистрированные анионные токи были ниже приблизительно в 3 раза по сравнению с токами, опосредованными выходом малата из клеток. Токи данных анионов характеризовались быстрой кинетикой активации и слабой потенциал-зависимостью, что указывает на то, что плазматическая мембрана клеток ризодермы *A. thaliana* пропускала очень небольшие количества данных органических анионов, вероятно, вследствие работы ALMT-подобных анионных каналов.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б24-060).

Библиографические ссылки

1. Demidchik, V. Mechanisms and physiological roles of K^+ efflux from root cells / V. Demidchik // J. Plant Physiol. – 2014. – Vol. 171. – P. 696–707.
2. Early copper-induced leakage of K^+ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux / A. S. Murphy [et al.] // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 121. – P. 1375–1382.
3. Demidchik, V. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses / V. Demidchik, E. V. Tyutereva, O. V. Voitsekhovskaja // Funct. Plant Biol. – 2018. – Vol. 45. – P. 28–46.
4. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death / V. Demidchik [et al.] // J. Cell Sci. – 2010. – Vol. 123. – P. 1468–1479.
5. A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H_2O_2 / C. Garcia-Mata [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, № 38. – P. 29286–29294.
6. Anion channels in plant cells / H. Kollist [et al.] // FEBS J. – 2011. – Vol. 278. – P. 4277–4292.
7. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter / T. Sasaki [et al.] // Plant J. – 2004. – Vol. 37. – P. 645–653.
8. Demidchik, V. Sodium fluxes through non-selective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis thaliana* roots / V. Demidchik, M. Tester // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 128, № 2. – P. 379–387.
9. Kinraide, T. B. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer / T. B. Kinraide, D. R. Parker, R. W. Zobel // J. Exp. Bot. – 2005. – Vol. 56, № 417. – P. 1853–1865.

Сиднонимины как модуляторы ответа растений на действие засухи
**Гурина А. К.^{А*}, Леонова Т. С.^Б, Шумилина Ю. С.^Б, Маргарит А. А.^Б,
Силинская С. А.^Б, Орлова А. А.^Б, Соболева А. В.^{Б,Д}, Черепанов И. А.^Б,
Калганова Н. В.^Б, Билова Т. Е.^{А,Б}, Камионская А. М.^Г,
Черевацкая М. А.^А, Фролов А. А.^Б**

^А Кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская наб, 7/9, Санкт-Петербург, Россия;

^Б Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологии, Институт Физиологии Растений им. К. А. Тимирязева, РАН, Ботаническая ул. 35, Москва, Россия;

^В Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия;

^Г Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Российская Федерация

^Д Институт биохимии растений, Галле, Германия.

*E-mail: gnastyak0@gmail.com

Ключевые слова: *Pisum sativum*, ВЭЖХ-МС, засуха, протеомика, сиднонимины, фитоэфффекторы.

Широко известно, что засуха представляет собой один из ключевых климатических факторов, негативно сказывающихся на продуктивности растений и качестве урожая. По мере развития молекулярных методов исследования и, как следствие, нашего понимания механизмов, лежащих в основе развития ответа на стресс, в биотехнологии был разработан ряд подходов для его модуляции. Фитоэфффекторы – разнородная группа химических соединений, воздействующих на различные молекулярные мишени в организме растений и нацеленных на модуляцию ответа на стрессоры различной природы, повышение урожайности, увеличение биомассы и прочие показатели продуктивности. Их исследование предполагает комплексный подход, включающий в себя подбор оптимальных концентраций и матрицы (растворителя) с последующим анализом биодоступности вещества для растения, поиск наиболее эффективного способа аппликации и тестирование на различных сельскохозяйственных культурах на уровне физиологии, динамики биохимических маркеров стресс-ответа и, в конечном итоге, эфффектор-зависимых изменениях метаболома и протеома.

Химические вещества из группы сиднониминов представляют собой перспективные фитоэфффекторы. Это мезоионные гетероциклические соединения, интерес к которым в качестве эфффекторных агентов вызван, в частности, их способностью генерировать оксид азота (NO). Предполагается, что, являясь донорами NO, данные соединения способны регулировать активность определенных белков, задействованных в защитных пу-

тях (в частности, регуляции гормонального сигналинга), через нитрозилирование остатков цистеина в полипептидной цепи. Ранее было показано, что тестируемые сиднонимины В1-01 и SP-13 проявляли протекторные свойства, а В1-05 – гербицидные. После проведения предварительной оценки стресс-ответа растений гороха на физиологическом и биохимическом уровне, был выполнен протеомный анализ семян молочной спелости в трех вариантах обработки сиднониминами: предобработка семян, обработка листьев или комбинированная обработка. Для этого было проведено выделение тотальной фракции белка семян, которая была подвергнута ограниченному протеолизу трипсином и проанализирована с помощью нанопоточной обратнофазовой жидкостной хроматографией, сопряженной онлайн с масс-спектрометром Orbitrap Fusion Tribrid (nanoRP-HPLC-LIT/Q-Orbitrap-MS). Статистический анализ на базе программного обеспечения Protome Discoverer 2.2, Progenesis Q1 с последующей обработкой данных в среде программирования R позволил выявить белки, дифференциально-экспрессированные в ответ на воздействие засухи и сиднониминнов, установить их функциональные классы и субклеточную локализацию. В результате было выдвинуто предположение о протекторном потенциале исследуемых веществ.

Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда (проект 22-26-00337).

Роль антрахинона париетина в устойчивости к обезвоживанию талломов лишайника *Xanthoria parietina*

**Даминова А. Г.^{А*}, Лексин И. Ю.^А, Хабибрахманова В. Р.^А,
Гурьянов О. П.^А, Галеева Е. И.^А, Трифонова Т. В.^А, Beckett R. P.^Б,
Минибаева Ф. В.^А**

^А Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия.

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

^Б School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Scottsville, South Africa

Лишайники представляют собой фотосинтезирующие симбиотические ассоциации, таллом которых образован двумя основными партнерами – микобионтом (грибной партнер, в основном, аскомицеты) и фотобионтом (водоросль или цианобактерии) (Eisenreich et al., 2011). Лишайники отличаются разнообразием форм и цвета и могут произрастать на поверхности почти каждого субстрата, включая почву, камни, кору деревьев. Лишайники относят к экстремофильным организмам ввиду их феноменальной устойчивости к действию неблагоприятных факторов окружа-

ющей среды, таких как обезвоживание, перепады температур, ультрафиолетовое (УФ) излучение (Armstrong, 2017). Среди механизмов высокой стрессовой устойчивости лишайников немаловажную роль может играть синтез вторичных метаболитов (Daminova et al., 2022). Большинство работ, посвященные исследованиям вторичных метаболитов, сфокусированы на их потенциальном применении в медицине. Вторичные метаболиты обладают антибиотическими, антимикотическими и противовирусными свойствами (Basile et al., 2015). Например, ярко-оранжевый антрахинон париедин (также называемый фисцион), представляет собой пигмент лишайников рода *Caloplaca* и *Xanthoria*. Однако, париедин можно обнаружить также у покрытосеменных растений, например, в корнях растения *Rumex crispus* (Choi et al., 2004). *Xanthoria parietina* (Ascomycota, Teloschistaceae) это распространенный по всему миру эпифитный вид лишайника, предпочитающий богатые азотом места обитания. Лишайник образует слоевища, цвет которого варьирует от бледно-зеленого до ярко-оранжевого. Пигментация талломов усиливается под воздействием солнечной радиации (Lindblom, Ekman, 2007; Beck, Mayr, 2012). Характерный оранжевый цвет талломов лишайника обусловлен присутствием кристаллов париедина, которые накапливаются, в основном, на поверхности верхнего кортекса (Gauslaa, McEvoy, 2005). Широко изучена фотопротекторная роль париедина при интенсивном УФ-Б (Solhaug, Gauslaa, 2012). Кроме того, показано, что париедин защищает таллом *X. parietina* от токсического действия кадмия, снижая воздействие окислительного стресса, вызванного кадмием (Kalinowski et al., 2015). Однако, защитная роль париедина в устойчивости талломов лишайника *X. parietina* к обезвоживанию, малоизучена на сегодняшний день. Можно предположить, что талломы лишайника *X. parietina*, приобретают ярко-оранжевое окрашивание при воздействии солнечной радиации и нуждаются в дополнительной защите от обезвоживания. Париедин, как антрахинон, является гидрофобным соединением, может способствовать гигроскопичности верхней части корового слоя (Souza-Egipsy et al., 2000). В связи с этим, целью настоящей работы было изучение роли париедина в устойчивости *X. parietina* к обезвоживанию. В литературе представлены единичные работы по характеристике морфологии пигментированных талломов лишайников, что может быть связано со сложностью анатомического строения таллома, взаимодействием грибных и фотосинтезирующих симбионтов и разнообразием путей биосинтеза метаболитов. Морфология и топография талломов лишайника могут обуславливать его физико-химические свойства и физиологические функции. В рамках данной работы нами было проведено сравнение структурных и физиолого-биохимических характеристик трех типов талломов *X. parietina*: бледно-зеленого, ярко-оранжевого и ярко-

оранжевого таллома, из которого париедин был удален путем промывки ацетоном. Ранее Solhaug и Gauslaa продемонстрировали применение этого метода для удаления лишайниковых веществ из талломов с целью сравнения эффектов стрессовых воздействий на талломы с присутствием париедина или без него (Solhaug, Gauslaa, 2004). В нашей работе, гидратированные ярко-оранжевые и промытые ацетоном талломы *X. parietina* выдерживались в эксикаторе над насыщенным раствором CaCl_2 в течение 4 и 14 ч. Скорость потери воды из обоих типов талломов была схожей, и после высушивания в течение 4 ч относительное содержание воды снижалось примерно до 50 %, а через 14 ч — примерно до 10 %. Последующая регидратация в течение 1 ч приводила к почти полному восстановлению относительного содержания воды. Интересно, что при более медленном высыхании над насыщенным раствором NaCl скорость потери воды ярко-оранжевыми талломами была немного медленнее, чем талломами, промытые ацетоном, в течение первых 6 ч, хотя дальнейшая потеря воды (до 24 ч) происходила с одинаковой скоростью в обоих типах талломов. Нами была проведена оценка эффективности фотосинтеза, которая показала, что удаление париедина из предварительно высушенных талломов оказывает незначительное влияние на фотосинтетическую активность, а относительные значения максимальной фотосинтетической активности фотосистемы II в ярко-оранжевых и промытых ацетоном талломах снижались схожим образом во время обезвоживания. Однако, абсолютные значения активности фотосистемы II были немного ниже в промытых ацетоном талломах лишайника *X. parietina*. Интересно, что Ndhlovu с соавторами обнаружили, что в других видах лишайников (содержащих вторичные метаболиты, отличные от париедина) удаление веществ в целом снижало влияние обезвоживания на активность ФСII *X. parietina* (Ndhlovu et al., 2024). Это может быть вызвано повышением уровня окислительного стресса в лишайниках в отсутствие лишайниковых веществ, обладающих высокой антиоксидантной активностью. В подтверждение данного предположения нами были выявлены различия в общем уровне перекисного окисления липидов в талломах *X. parietina*. Перекисное окисление липидов, определяемое по содержанию малонового диальдегида, в промытых ацетоном талломах значительно увеличивалось во время обезвоживания, тогда как в ярко-оранжевых талломах этот показатель увеличивался лишь незначительно. После регидратации уровень перекисного окисления липидов снижался до исходных значений в обоих типах талломов. Мы предполагаем, что антиоксидантные свойства париедина (Hidalgo et al., 1994) могут снижать уровень перекисного окисления липидов, и, тем самым, повышать стабильность мембран *X. parietina* во время обезвоживания. Индекс ста-

бильности мембран во время цикла обезвоживание/регидратации оставался выше в ярко-оранжевых талломах, чем в непигментированных талломах. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что удаление вторичных метаболитов с внешней поверхности таллома повышает проницаемость мембран во время регидратации после обезвоживания.

С помощью световой микроскопии поперечных срезов бледных талломов *X. parietina* нами были визуализированы слабо пигментированные клетки в верхнем коровом слое, ниже которых находится непигментированный слой микобионта, за которым следует слой фотобионта, включающий *Trebouxia* sp. В ярко-оранжевых талломах был обнаружен темно-коричневый слой на поверхности верхнего кортекса, тогда как в промытых ацетоном талломах этот слой был только слегка пигментирован. С помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии мы визуализировали микроструктуру поперечных срезов бледных, ярко-оранжевых и промытых ацетоном талломов *X. parietina*. Рельеф поверхности верхнего корового слоя срезов талломов лишайника был неоднородным с углублениями и выпуклостями, содержащими игольчатые кристаллы. Большинство вторичных метаболитов лишайников обычно представляют гидрофобные кристаллы, нерастворимые в воде (Huneck, et al., 1996). Было обнаружено, что у *X. parietina* поверхность верхнего кортекса ярко-оранжевых талломов была толще, чем у бледных талломов. Кроме того, в верхнем коровом слое бледных талломах диаметр пор, представляющих собой просветы грибных гиф, на единицу площади поперечного сечения был примерно в 1,6 раза больше, чем в ярко-оранжевых талломах, что свидетельствует об утолщении клеточных стенок последних. После промывания ярко-оранжевых талломов ацетоном толщина клеточных стенок существенно не изменилась. Анализ ультраструктуры микобионта показал, что вторичные метаболиты накапливались в бледных, ярко-оранжевых и промытых ацетоном талломах, однако в ярко-оранжевых талломах количество включений, вероятно, содержащих париетин, внутри гиф и в межгифовом пространстве, было выше. В промытых ацетоном талломах включения наблюдались во внутреннем слое между просветами гиф. Накопление париетина внутри клеток и в межгифовом пространстве у *X. parietina*, вероятно, происходит из-за накопления сахара рибитола, который синтезируется фотобионтом и передается микобионту (Pichler et al., 2023). Рибит является предшественником париетина, аккумулируется в гифах микобионта в двух формах в равных количествах с образованием внутриклеточного париетина и внеклеточного кристаллического париетина (Pichler et al., 2023). При визуализации ацетонового экстракта, выделенного из ярко-оранжевого таллома *X. parietina*, нами было обнаружено наличие нерегулярных игольчатых кристаллов париетина. Морфология

париетина, извлеченного из *X. parietina*, была похожа на морфологию коммерческого париетина в ярко-желтом ацетоновом растворе, который также выглядел также как игольчатые кристаллы (Mugas et al., 2021). С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) нами было подтверждено соответствие основного профиля элюирования ацетонового экстракта *X. parietina* профилю стандарта париетина. Количественное определение париетина в ацетоновых экстрактах из бледных и ярко-оранжевых талломов показало, что более высокий уровень этого пигмента обнаруживается в оранжевых талломах по сравнению с бледными талломами, в то время как выход общих экстрагируемых веществ был немного выше из бледных талломов. Нами обнаружено, что обезвоживание талломов вызвало противоположный эффект на выход экстрактивных веществ и содержание париетина в бледных и ярко-оранжевых талломах. В то время как выход экстрактивных веществ из обезвоженных бледных талломов увеличился, у ярко-оранжевых талломов этот показатель значительно (до 50%) снижался. Можно предположить, что из обезвоженных бледных талломов нами извлекались не только внеклеточные, но и внутриклеточные метаболиты. Это может быть результатом повреждения мембран, вызванного окислительным стрессом во время обезвоживания. Присутствие париетина в ярко-оранжевых талломах вероятно предотвращает выход веществ из сухих талломов, однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные экспериментальные доказательства. Содержание париетина снижалось в обезвоженных бледных талломах и немного увеличилось в ярко-оранжевых талломах. После последующей регидратации, независимо от степени пигментации талломов, наблюдалось значительное снижение содержания экстрактивных веществ. Уровень париетина восстанавливался в оранжевых талломах и оставался довольно низким в бледных талломах. Возможно, бледные талломы в целом менее устойчивы к стрессовому воздействию и по сравнению с пигментированными талломами имеют более низкую активность антиоксидантных ферментов. При обезвоживании в бледных талломах париетин, возможно, действует как антиоксидант, что обуславливает снижение содержания париетина. Напротив, ярко-оранжевые талломы, подвергавшиеся воздействию солнечной радиации в течение длительного времени, более устойчивы к стрессу из-за накопления париетина и осмопротекторных метаболитов, таких как полиолы и глицерин, что объясняет более высокую антиоксидантную защиту и морфологические изменения в структуре таллома. С помощью метода термогравиметрии было подтверждена роль париетина в улучшении водного обмена в талломах лишайника и структурной организации ярко-оранжевых талломов *X. parietina*. Таким

образом, в нашей работе мы показали, что присутствие кристаллов оранжевого пигмента париетина влияет на анатомию и физиологию талломов лишайника *X. parietina* при обезвоживании. Париедин может играть защитную роль в устойчивости лишайников при стрессовом воздействии, стабилизируя мембраны микобионта, обеспечивая антиоксидантную защиту, а также формируя структурный барьер в верхнем коровом слое талломов *X. parietina*. Наши результаты представляют новое понимание опосредованных париетином ультраструктурных, физиологических и биохимических механизмов устойчивости лишайника *X. parietina* к стрессовым воздействиям окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда № 23-14-00327 и частично в рамках выполнения госзадания КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Библиографические ссылки

1. Armstrong, R.A. Adaptation of lichens to extreme conditions. In: eds. Shukla V.; Kumar, S.; Kumar, N. Plant adaptation strategies in changing environment. Singapore, Springer, 2017; pp. 1–27.
2. Basile, A.; Rigano, D.; Loppi, S.; Di. Santi, A.; Nebbioso, A.; Sorbo, S.; Conte, B.; Paoli, L.; De Ruberto, F.; Molinari, A.M.; Altucci, L.; Bontempo, P. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 7861–7875.
3. Beck, A.; Mayr, C. Nitrogen and carbon isotope variability in the green-algal lichen *Xanthoria parietina* and their implications on mycobiont-photobiont interactions. *Ecol. Evol.* 2012, 2, 3132–3144.
4. Choi, G.J.; Lee, S.W.; Jang, K.S.; Kim, J.S.; Cho, K.Y.; Kim, J.C. Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. *Crop Protect.* 2004, 23, 1215–21.
5. Daminova, A.G.; Rogov, A.M.; Rassabina, A.E.; Beckett, R.P.; Minibayeva, F.V. Effect of melanization on thallus microstructure in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *J. Fungi.* 2022, 8, 791.
6. Eisenreich, W.; Knispel, N.; Beck, A. Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. *Phytochem. Rev.* 2011, 10, 445–456.
7. Gauslaa, Y.; McEvoy, M. Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic Appl. Ecol.* 2005, 6, 75–82.
8. Hidalgo, M.E.; Fernández, E.; Quilhot, W.; Lissi, E.A. Antioxidant capacity of depsides and depsidones. *Phytochemistry.* 1994, 37, 1585–1587.
9. Huneck, S.; Yoshimura, I.; Huneck, S.; Yoshimura, I. Identification of lichen substances; Springer, Berlin, Heidelberg, 1996; pp. 11–123.
10. Kalinowski, R.; Bačkor, M.; Pawlik-Skowrońska, B. Parietin in the tolerant lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. increases protection of Trebouxia photobionts from cadmium excess. *Ecol. Indic.* 2015, 58, 132–138.
11. Lindblom, L.; Ekman, S. New evidence corroborates population differentiation in *Xanthoria parietina*. *Lichenologist.* 2007, 39, 259–271.

12. Mugas, M. L.; Calvo, G.; Marioni, J.; Céspedes, M.; Martinez, F.; Sáenz, D.; ... Casas, A. Photodynamic therapy of tumour cells mediated by the natural anthraquinone parietin and blue light. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2021, 214, 112089.
14. Ndhlovu, N.T.; Minibayeva, F.; Beckett, R.P. A role for secondary metabolites in desiccation tolerance in lichens. *Microbiol. Res.* 2024, 15, 225–235.
15. Pichler, G.; Grube M.; Muggia L.; Carniel C.F.; Kranner I. How to build a lichen: from metabolite release to symbiotic interplay. *New Phytol.* 2023, 238, 1362–1378.
16. Solhaug, K.A.; Gauslaa, Y. Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Plant Cell Environ.* 2004, 27, 167–176.
17. Solhaug, K.A.; Gauslaa, Y. Secondary lichen compounds as protection against excess solar radiation and herbivores. *Prog. Botan.* 2012, 73, 283–304.
18. Souza-Egipsy, V.; Valladares, F.; Ascaso, C. Water distribution in foliose lichen species: interactions between method of hydration, lichen substances and thallus anatomy. *Ann. Botan.* 2000, 86, 595–601.

Сигнальный хаб на основе цитоплазматического Ca^{2+} и активных форм кислорода в клетках высших растений

Демидчик В. В.^{А*}

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: dzemidchyk@bsu.by

Растения способны воспринимать внешние факторы посредством широкого спектра рецепторов, передающих информацию на систему вторичных посредников, таких как цитоплазматический Ca^{2+} , циклические нуклеотиды и другие вещества. Некоторые рецепторы непосредственно сопряжены с Ca^{2+} -проницаемыми ионными каналами и могут очень быстро кодировать информацию в форме мощных и разнообразных по форме флуктуаций цитоплазматического Ca^{2+} . В то же время, практически любое внешнее воздействие, в особенности, стрессовое, не обходится без генерации активных форм кислорода (АФК). Этот процесс развивается также быстро, как и Ca^{2+} -сигналы, в ответ на те же факторы, что наводит на мысль об их общей («единой») природе. Более того, АФК способны активировать повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме, а цитоплазматический Ca^{2+} стимулировать работу важнейших ферментов синтеза АФК – НАДФН-оксидаз. В течение последних двух десятилетий нами и другими авторами развивается концепция так-называемого АФК/ Ca^{2+} -хаба – распределительного сигнального центра в плазматической мембране растительной клетки, который управляет разнообразными по силе и качеству внешними сигналами. Данный хаб, вероятно, несет ответственность за распознавание гормональных и других химических сигналов, неспецифические и специфические стрессовые ответы, а также за процессы роста,

развития и полярности у высших растений. В представленной работе детально рассматриваются компоненты данного АФК/ Ca^{2+} -хаба, аспекты их работы и критические функции в клеточной сигнализации у растений.

Роль активных форм кислорода в инициации и развитии бокового корня

Демченко К. Н.^{A*}, Кирюшкин А. С.^A

^A *Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия.*

**E-mail: demchenko@binran.ru*

У большинства растений боковые корни возникают выше зоны растяжения, однако существует группа семейств (Тыквенные, Гречишные, водные однодольные и др.), чьи представители иницируют примордии бокового корня непосредственно в меристеме родительского. Такой тип инициации бокового корня приводит к быстрому ветвлению корневых систем. Ключевым фактором при обоих типах инициации бокового корня является ауксин. На каждом этапе определения судьбы клеток корня он последовательно запускает различные регуляторные генетические модули. Состав этих генетических модулей и различия в регуляции при различных типах образования бокового корня будет критически рассмотрен.

В ходе эволюции наземных растений развивалась пластичность ветвления корневых систем, появлялись различные формы и стратегии ветвления корня. Способность корней к ветвлению в разнородной по своему составу почве в значительной степени определила успешность колонизации суши растениями, в том числе и в засушливых регионах. Несмотря на разнообразие и значительное различие в типах ветвления корневых систем, существует ряд общих молекулярных механизмов и регуляторных генетических модулей, определяющих компетенцию отдельных клеток корня к образованию бокового корня. В докладе будут рассмотрены пути формирования этих генетических модулей в ходе эволюции семенных растений, а также их становление у предковых форм.

Активные формы кислорода (ROS) играют двоякую роль в биологии растений, выступая как важные молекулы передачи сигнала и как токсичные побочные продукты аэробного метаболизма, которые накапливаются в клетках при воздействии различных стрессовых факторов и приводят к гибели клеток. Архитектура корневых систем растений регулируется распределением и межклеточным транспортом ауксина. Производство ROS необходимо для роста корня, правильной дифференциации тканей, роста клеток и индукции боковых корней. Исследования последних лет пока-

зали важность роли ROS как регуляторов роста в процессах развития корней растений, таких как поддержание активности меристемы, рост растяжением, инициация и развитие боковых корней, корневых волосков, эндодермы и ксилемы. Все эти процессы включают многогранное взаимодействие между стабильными уровнями ROS и транскрипционными регуляторами, фитогормонами и питательными веществами почвы. Мы попытаемся обобщить последние данные о том, как ROS участвуют на некоторых стадиях развития корня растения во время пролиферации, растяжения и дифференциации клеток. Кроме того, в этом докладе мы покажем, что ROS является важным модулятором распределения и клеточной реакции на ауксин в корне. Изменения в балансе ROS приводят к изменению распределения и реакции на ауксин у мутантов с потерей функции SOD и RHD2. Одновременное добавление в среду ауксина и ROS усиливает инициацию примордиев бокового корня, а иммунолокализация белка PIN демонстрирует существующую связь между ауксином и ROS в управлении делением клеток и потоком ауксина во время развития корня. В корнях арабидопсиса генетические изменения баланса ROS приводят к дефектам распределения ауксина и реакций, связанных с ростом корней. Также, особое внимание будет уделено роли ауксина в единой координации ветвления корня Тыквенных, а также малым сигнальным пептидам RALF34 в формировании регуляции ответа на стресс. Кроме того, мы попытаемся определить, как эти знания могут способствовать направленному изменению сельскохозяйственных культур.

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания «Структурно-функциональные и молекулярно-генетические основы развития и адаптации высших растений» (№ 1021071912890-3-1.6.11).

Антирадикальная активность экстрактов из культур клеток и тканей эхинацеи пурпурной

Дитченко Т. И.^{А*}, Карманов А. А.^А, Лосев Е. Л.^А

^А *Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь, *E-mail: ditchenko@bsu.by*

Фенольные соединения являются основными антиоксидантами растительного происхождения, сочетающими способность ингибировать процессы свободнорадикального окисления в живых организмах с низкой токсичностью [1]. Их биологическая активность зависит от строения, количества, расположения гидроксильных групп в бензольном ядре, а также степени полимеризации. Богатым источником вторичных метаболитов фенольной природы являются представители рода эхинацея (*Echinacea*

Moench). Эхинацея как лекарственное растение обрела известность во многом благодаря популяризации фитотерапии и тенденции к ограничению использования синтетических лекарственных средств. Сегодня производятся как препараты эхинацеи, так и содержащие ее биологически активные добавки, которые рекомендуют для профилактики и лечения инфекционных и воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей. Перспективными объектами биотехнологии лекарственных растений являются культуры клеток и органов эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). Биомасса суспензионных культур и культур адвентивных корней эхинацеи выступает в качестве источника фенолпропаноидов (гидроксикоричные кислоты и их производные), полисахаридов [2,3]. Экстрактивные вещества из недифференцированных клеток представителей рода *Echinacea* используются при производстве косметических средств либо в качестве биологически активных добавок (субстанции Echinan 4P, Echinaceae Stems GX и Echigena plus) [4,5]. Для разработки экономически рентабельных технологий получения БАВ из культур клеток и тканей растений необходим подбор оптимальных условий ферментации и дальнейшей процедуры извлечения целевых метаболитов. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование условий экстрагирования на степень проявления антирадикальной активности (АРА) экстрактов из каллусной и суспензионной культур *Echinacea purpurea*.

Для культивирования клеток и тканей эхинацеи пурпурной была использована питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга с добавлением 3% сахарозы, 0,2 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л ИУК и 0,5 мг/л кинетина. Длительно пассируемая каллусная культура имела рыхлую консистенцию и характеризовалась хорошо выраженной желто-оранжевой окраской. Суспензионная культура по степени агрегированности относилась к среднеагрегированному типу, включала клетки преимущественно сферической формы и небольшие агрегаты. Для получения водно-спиртовых экстрактов точную навеску биомассы измельченной сухой биомассы каллусной либо суспензионной культуры (0,2 г) тщательно растирали в ступке с добавлением небольшого количества 70%-ного этанола, затем доводили объем до 20 мл. Экстрагирование проводилось при температурах 50, 80 и 100°C. Продолжительность процедуры варьировала от 15 до 150 мин. Определение АРА проводили с помощью метода, основанного на ингибировании стабильного хромоген-радикала 2,2-дифенилпикрил-1-гидразида (ДФПГ). К его достоинствам относятся высокая воспроизводимость, простота выполняемых операций, общедоступность необходимого оборудования, высокая чувствительность, высокая селективность по отношению к антирадикальным антиоксидантам [6].

На первом этапе работы были получены данные по АРА известных антиоксидантов разной химической природы: кверцетина, аскорбиновой кислоты, хлорогеновой кислоты. Для этого получали концентрационные зависимости ингибирования радикала ДФПГ в присутствии этанольных растворов указанных соединений в диапазоне концентраций от 0,5 до 50 мкМ. Установлено, что ингибирующий эффект кверцетина в максимальной из испытанных концентраций достигал в среднем $(88,7 \pm 0,8) \%$. В случае спиртовых растворов аскорбиновой кислоты и хлорогеновой кислоты в концентрации 50 мкМ ингибирующий эффект составил $(80,1 \pm 4) \%$ и $(74 \pm 8) \%$, соответственно. Для более точной оценки АРА исследуемых соединений было проведено определение величины EC_{50} , т.е. концентрации антиоксиданта, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование радикалов ДФПГ. Согласно полученным данным показатели АРА кверцетина и аскорбиновой кислоты практически не различались между собой. Для хлорогеновой кислоты величина EC_{50} была примерно на 20% выше относительно кверцетина, что свидетельствует о более низкой АРА данного соединения.

На следующем этапе были проанализированы уровни АРА водно-спиртовых экстрактов из биомассы каллусной и суспензионной культур эхинацеи пурпурной в зависимости от температурного режима и продолжительности экстрагирования. С целью установления оптимальных условий для достижения максимальной АРА экстрактов были протестированы 3 режима, в которых экстрагирование производилось при кипячении с обратным холодильником ($100^{\circ}C$), а также при нагревании на водяной бане при температуре $80^{\circ}C$ либо $50^{\circ}C$ в течение определенного времени (от 15 до 150 мин). В случае каллусной культуры не обнаружено достоверных различий в показателях АРА экстрактов, полученных при $100^{\circ}C$, при варьировании продолжительности экстрагирования от 15 до 45 мин. При кипячении в течение 60 мин отмечалось снижение АРА на 10% относительно варианта с минимальной продолжительностью экстракции (15 мин). Аналогичная картина наблюдалась при снижении температуры экстрагирования до $80^{\circ}C$. При 15-ти минутном экстрагировании величина АРА составила $(74,5 \pm 1,5) \%$, тогда как при экстрагировании в течение 120 мин – $(65,9 \pm 1,6) \%$. При проведении экстрагирования на водяной бане при температуре $50^{\circ}C$ не обнаружено достоверных различий в величинах АРА при варьировании продолжительности процесса от 45 до 150 мин. Таким образом, при всех исследованных температурных режимах увеличение продолжительности получения экстрактов из каллусной культуры *Echinacea purpurea* не сопровождалось возрастанием АРА.

В отличие от каллусной культуры АРА экстрактов, полученных из суспензионной культуры при кипячении с обратным холодильником, снижалась при увеличении продолжительности экстрагирования от 15 до 60 мин. При получении экстрактов при 80°C также происходило снижение АРА при более длительных процедурах экстрагирования (60 и 120 мин) по сравнению с 30-ти минутной экстракцией. В третьей серии экспериментов, в которой экстрагирование осуществлялось при 50°C, получены результаты, согласно которым АРА достоверно повышалась при увеличении продолжительности до 120 и 150 мин. Так, если при 45-ти минутной экстракции величина АРА составила в среднем $(47,1 \pm 1,1) \%$, то при 120-ти минутной экстракции – $(56,2 \pm 2,1) \%$, а при 150-ти минутной – $(58,1 \pm 4,8) \%$. Таким образом, при получении экстрактов из суспензионной культуры *Echinacea purpurea* при 100°C и 80°C увеличение продолжительности экстрагирования не приводило к росту АРА полученных экстрактов. В случае экстрагирования при 50°C наиболее высокие показатели АРА отмечались при 120-ти и 150-ти минутном экстрагировании.

Сравнительный анализ АРА экстрактов из каллусной и суспензионной культур *Echinacea purpurea* показал, что в условиях проведения экстрагирования при 100°C достоверные различия между анализируемыми показателями отмечались при 30-ти и 45-ти минутном кипячении с обратным холодильником. В случае экстрагирования при 80°C уровни АРА экстрактов из каллусной и суспензионной культур не различались между собой. Экстракты, полученные из каллусной культуры при 50°C, характеризовались достоверно более высокой АРА по сравнению с экстрактами, полученными из суспензионной культуры, при продолжительности экстрагирования от 45 до 120 мин. При проведении экстрагирования в течение 150 мин при температуре 50°C различия в величинах АРА экстрактов из каллусной и суспензионной культуры отсутствовали.

Как для каллусной, так и для суспензионной культуры, экстракты, полученные в течение 30 мин при температурах 100°C и 80°C, характеризуются равными показателями проявления АРА. При проведении экстрагирования в течение 45 мин и 60 мин отмечается резкое снижение АРА при температурных режимах 80°C и 50°C по сравнению с кипячением при 100°C. При проведении экстрагирования в течение 90 мин также наблюдаются достоверные различия в уровнях АРА экстрактов, полученных при 80°C и 50°C. При проведении экстрагирования в течение 120 мин достоверные различия между вариантами отсутствуют. При проведении экстрагирования в течение 150 мин при температуре 50°C АРА экстрактов, полученных из каллусной культуры *Echinacea purpurea* снижается до $(60,6 \pm 2,4) \%$, в случае суспензионной культуры – до $(58,1 \pm 4,8) \%$, что в

среднем в 1,2 раза ниже по сравнению с наиболее оптимальным вариантом.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что оптимальными условиями экстрагирования для достижения наиболее высокой АРА экстрактов из каллусной и суспензионной культур эхинацеи пурпурной является проведение кипячения при 100°C в течение 15 мин. При этом показатели АРА 0,01%-ных водно-спиртовых экстрактов не уступают по величине активности таких известных антиоксидантов как аскорбиновая кислота и кверцетин в концентрации 50 мкМ. Установленные закономерности могут быть использованы для оптимизации технологий получения экстрактов из биомассы культур клеток и тканей эхинацеи пурпурной.

Библиографические ссылки

1. Меньщикова, Е.Б. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Структура, свойства, механизмы действия / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.В. Кандалинцева. – Lambert Academic Publishing, 2012. – 495 с.
2. Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations / J.L. Parsons [et al.] // *Pharm Biol.* – 2018. – Vol. 56, №1. – P. 485–494.
3. Анализ производных кофейной кислоты в каллусной культуре *Echinacea purpurea* / Т.И. Дитченко, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, О.В. Молчан, В.М. Юрин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Том 7. № 2. – С. 54-63.
4. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends / R. Eibl [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 102, № 20. – P. 8661–8675.
5. Villarreal M.O. Plant cell culture strategies for the production of natural products / M.O. Villarreal [et al.] // *BMB Reports.* – 2016. – Vol. 49, № 3. – P. 149–158.
6. Филиппенко, Т.А. Фенольные соединения растительных экстрактов и их активность в реакции с дифенилпикрилгидразилом / Т.А. Филиппенко, Н.И. Белая, А.Н. Николаевский // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – № 8. – С. 34-36.

Влияние нанокompозитов хитозан-серебро на компоненты антиоксидантной системы микроклональных растений картофеля в культуре *in vitro*

**Еловская Н. А.^{А*}, Калацкая Ж. Н.^А, Рыбинская Е. И.^А,
Гилевская К. С.^Б, Куликовская В. И.^Б**

^А Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, лаборатория роста и развития растений, Минск, Беларусь. *E-mail: yalouskaya92@mail.ru

^Б Институт химии новых материалов НАН Беларуси, лаборатория микро- и наноструктурированных систем, Минск, Беларусь

Серебро, благодаря антибактериальным и фунгицидным свойствам, активно используется для синтеза наночастиц (НЧ), широко применяемых

в сельском хозяйстве. В процессе экологически чистого синтеза металлических НЧ дорогостоящие и потенциально опасные восстанавливающие и стабилизирующие агенты заменяются на природные полимеры. Одним из таких биополимеров является хитин и его производное – хитозан. В процессе синтеза amino- и гидроксильные группы хитозана образуют связи с поверхностью НЧ [1]. Получаемые таким образом стабилизированные НЧ серебра (НЧ Ag) способны проявлять свойства, присущие каждому из компонентов, а также синергетически усиливать их [2].

Несмотря на активное изучение взаимодействия НЧ Ag с растениями, подавляющая часть исследований учитывает лишь влияние размера НЧ на растительные клетки, но не принимает во внимание структуру НЧ и участие стабилизирующей оболочки в системе «растительная клетка – НЧ».

В связи с этим возникла необходимость изучить влияние нанокомпози́тов на основе НЧ Ag разных структурных типов, стабилизированных хитозаном, на растения. Для первичного скрининга использование культуры *in vitro* наиболее оправданно, т. к. позволяет в короткие сроки оценить характер взаимодействия соединений с растительным объектом.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния различных концентраций и структурных типов стабилизированных хитозаном НЧ серебра на редокс состояние растений картофеля в культуре *in vitro*.

Оздоровленные растения-регенеранты картофеля клонировали в стерильных условиях ламинар-бокса на стандартную агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС-среда) (агар – 5 г/л, сахароза – 30 г/л, аскорбиновая кислота – 3,0 мг/л, индолил-3-уксусная кислота – 1,0 мг/л, pH 5,7) и выращивали в течение 4-х недель, после чего проводили замену МС-среды на жидкие модифицированные, содержащие нанокомпози́ты хитозан-Ag (НК Хит-Ag4 и НК Хит-Ag5) двух структурных типов в различных концентрациях (табл. 1). Структура НК Хит-Ag4 представляет собой монодисперсные наночастицы серебра, собранные в сферические агрегаты, погруженные в хитозан, тогда как строение НК Хит-Ag5 соответствует структуре «ядро (наночастица Ag⁰) – оболочка (хитозан)» [3] Микроклоны выращивали на модифицированных МС-средах в течение 6 недель, после чего проводили оценку редокс-состояния растений на основании накопления в стеблях пероксида водорода и фенольных соединений, изменений антиоксидантной и антирадикальной активностей, а также – активности антиоксидантных ферментов – пероксидазы (ПО) и супероксиддисмутазы (СОД).

Таблица 1

Влияние нанокompозитов хитозан-серебро на отдельные биохимические показатели в стеблях микроклональных растений картофеля в культуре *in vitro*

Вариант	C _{хит} , мг/мл	C _{Ag} , мкг/ мл	Показатель			
			H ₂ O ₂ , мкмоль/г сырой массы	Фенольные соедине- ния, мг/г сухой массы	Общая АО ак- тивность, мМ/г сухой массы	Антирадикальная активность, %
Конт- роль	—	—	23,56±0,77 ^a	26,81±2,89 ^a	165,13±15,30 ^a	37,32±2,17 ^a
Хит-Ag4						
B1	0,1	1	27,18±0,94 ^b	34,96±1,36 ^b	141,58±8,76 ^a	56,77±1,86 ^b
B4	0,05	0,5	14,70±5,88 ^c	23,28±0,71 ^a	105,90±1,71 ^b	42,72±0,16 ^c
B7	0,01	0,1	8,40±3,99 ^c	25,18±0,53 ^a	125,65±6,00 ^b	40,46±1,87 ^a
Хит-Ag5						
B3	0,1	10	32,77±3,56 ^b	27,50±0,62 ^a	121,55±4,22 ^{bc}	56,52±2,08 ^b
B6	0,05	5	23,60±0,98 ^a	29,05±0,48 ^a	133,26±0,57 ^b	48,55±0,55 ^c
B2	0,01	1	25,59±0,90 ^a	24,92±1,66 ^a	106,49±12,86 ^c	40,11±2,96 ^a
B5	0,005	0,5	13,51±1,86 ^c	24,56±1,19 ^a	127,18±5,23 ^{bc}	39,07±0,82 ^a
B8	0,001	0,1	23,70±1,17 ^a	26,31±0,98 ^a	132,24±7,36 ^b	46,08±2,10 ^c

Примечание: Результаты представлены в виде $M \pm Sd$ (где M – это среднее арифметическое значение, Sd – стандартное отклонение) трех биологических повторностей. Варианты (B1, B4, B7) нанокompозита Хит-Ag4 и варианты (B3, B6, B2, B5, B8) нанокompозита Хит-Ag5 сравнивались с контролем, сравнение опытных вариантов двух нанокompозитов друг с другом не проводилось. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) характеризуют достоверные различия при $p \leq 0,05$.

Содержание пероксида водорода можно рассматривать в качестве первичного маркера стрессовой реакции растительного организма на воздействие любой природы. В вариантах B1 НК Хит-Ag4 и B3 НК Хит-Ag5, содержащих в составе стабилизирующей оболочки хитозан в концентрации 0,1 мг/мл, выявлено увеличение содержания пероксида водорода в стеблях микроклонов картофеля на 15,4 и 39,1% по сравнению с контролем соответственно (табл. 1). При этом значительное образование H₂O₂ в варианте B3 может быть связано с увеличением концентрации серебра до 10 мкл/мл по сравнению с вариантом B1 (табл. 1). В то же время, в варианте B2 НК Хит-A5, содержащего 1 мкл/мл Ag и в 10 раз больше хитозана по сравнению с вариантом B1 НК Хит-Ag4, содержание H₂O₂ сохранялось на уровне контрольных значений (табл. 1). В варианте B4 НК Хит-Ag4 выявлено снижение исследуемого показателя на 37,6% по сравнению с контрольными растениями, в то время как в варианте B6 НК Хит-A5, содержащего такую же концентрацию хитозана и в 10 раз больше серебра (5 мкг/мл против 0,5 мкг/мл в B4 НК Хит-Ag4) уровень H₂O₂ не изменялся по сравнению с контролем (табл. 1). При анализе влияния вариантов

В4 НК Хит-Ag4 и В5 НК Хит-Ag5, характеризующихся равными концентрациями Ag и различающихся содержанием хитозана в 10 раз, выявлено снижение образования H_2O_2 на 37,6 и 42,7% по отношению к контролю соответственно (табл. 1). В варианте В7 НК Хит-Ag4 содержание H_2O_2 снизилось на 64,3%, тогда как в варианте В8 НК Хит-Ag5 с более тонкой хитозановой оболочкой исследуемый показатель оставался на уровне контрольных значений (табл. 1).

Активность ПО возросла во всех вариантах НК Хит-Ag4 по сравнению с контролем (рис. 1а). Добавленный в МС-среду НК Хит-Ag5 в различных концентрациях оказал неоднозначное действие на пероксидазную активность (рис. 1б). Так, наиболее значительное усиление активности в работе фермента в 3,9 раза по сравнению с контролем было выявлено при использовании наименьшей концентрации хитозана – в варианте В8 (рис. 1б). В вариантах В3 и В6 активность ПО изменялась аналогичным образом – увеличение на 143,8 и 131,8% по сравнению с контролем (рис. 1б). Тогда как в вариантах В2 и В5 интенсивность ПО сохранялась на уровне контрольных значений (рис. 1б).

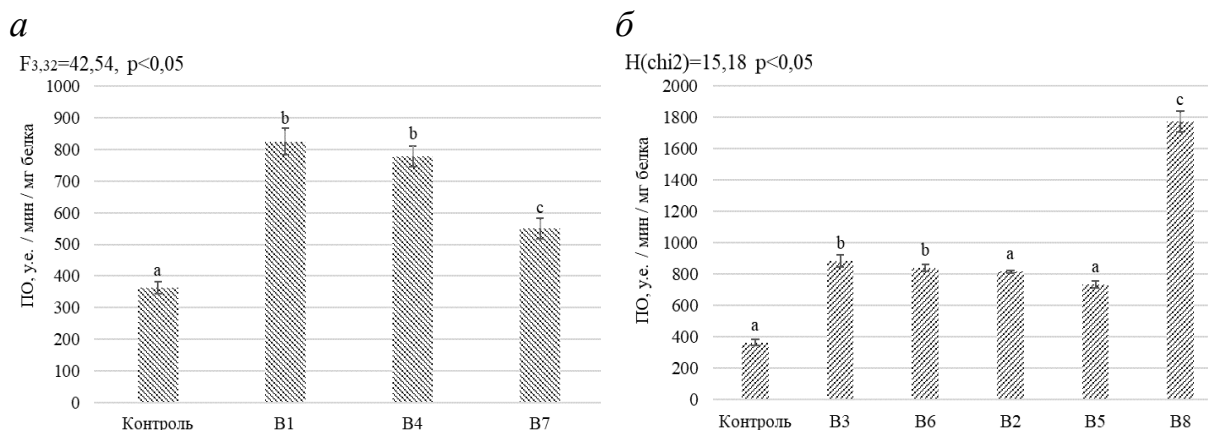


Рис. 1. Влияние НК Хит-Ag4 (а) и НК Хит-Ag5 (б) на активность пероксидазы (ПО) в стеблях микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

Примечание: Результаты представлены в виде $M \pm Se$ (где M – это среднее арифметическое значение, Se – стандартная ошибка) трех биологических повторностей. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) характеризуют достоверные различия при $p \leq 0,05$.

Варианты В1 и В3 НК Хит-Ag4 и Хит-Ag5, содержащие хитозан в концентрации 0,1 мг/мл и серебро – 1 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно, не повлияли на активность СОД (рис. 2а и 2б). В то же время, в варианте В2 выявлено увеличение активности фермента на 56,8% по сравнению с контролем (рис. 2б). В варианте В4 активность СОД снизилась на 12,8%, тогда как в варианте В6, с концентрацией серебра в 10 раз выше, и в варианте В5, с концентрацией хитозана в 10 раз меньше, исследуемый показате-

тель оставался на уровне контрольных значений (рис. 2а и 2б). В вариантах В7 НК Хит-Ag4 активность СОД снизилась на 75,4%, в то время как в варианте В8, содержащего в 10 раз меньше хитозана, активность СОД увеличилась на 58,1% по сравнению с контролем (рис. 2а и 2б).

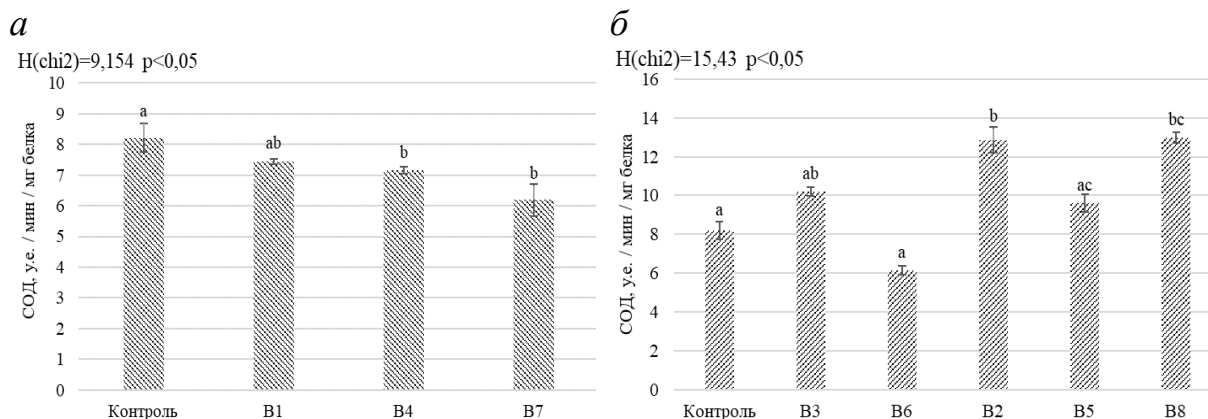


Рис. 2. Влияние НК Хит-Ag4 (а) и НК Хит-Ag5 (б) на активность

супероксиддисмутазы (СОД) в стеблях микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

Примечание: Результаты представлены в виде $M \pm Se$ (где M – это среднее арифметическое значение, Se – стандартная ошибка) трех биологических повторностей. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) характеризуют достоверные различия при $p \leq 0,05$.

Изменения в содержании фенольных соединений в стеблях микроклонов картофеля были выявлены в варианте В1 Хит-Ag4 – увеличение на 30,4% по сравнению с контролем (табл. 1). Общая антиоксидантная (АО) активность экстрактов микроклональных растений картофеля снизилась практически во всех вариантах по сравнению с контролем (табл. 1). Так, в вариантах В4 и В7 НК Хит-Ag4 исследуемый показатель снизился на 35,9 и 23,9% по сравнению с контролем соответственно (табл. 1). Все варианты НК Хит-Ag5 продемонстрировали снижение АО активности по сравнению с контролем (на 26,4% для варианта В3, на 19,3% для варианта В6, на 35,5% для варианта В2, на 23,0% для варианта В5 и на 19,9% для варианта В8) (табл. 1).

Антирадикальная активность экстрактов, выделенных из стеблей растений картофеля, усиливалась в вариантах В1 и В3 на 52,1 и 51,4% и в вариантах В4 и В6 на 14,5 и 30,1% по сравнению с контролем (табл. 1). При анализе влияния НК с одинаковым содержанием Ag, но различающихся по содержанию хитозана в составе стабилизирующей оболочки, были выявлены схожие изменения антирадикальной активности в вариантах В1 и В2, В4 и В5: при увеличении доли хитозана в составе НК усиливалась и антирадикальная активность (на 52,1% для варианта В1 и на 14,5% для варианта В4) по сравнению с контролем (табл. 1). В свою очередь, в вариантах В7 и В8 обнаружили обратный эффект: при уменьшении

содержания хитозана в 10 раз (с 0,01 мг/мл до 0,001 мг/мл) антирадикальная активность увеличилась на 23,5% (в варианте В8) по сравнению с контролем (табл. 1).

Таким образом, концентрации хитозана в серебросодержащем нанокompозите оказывают влияние на изменение компонентов антиоксидантной системы микрорастений картофеля. Варианты В1 и В3 значительно повышали содержание перекиси водорода и модифицировали антиоксидантный статус в растительной ткани, что, вероятно, указывает на их стрессовое воздействие. Структура нанокompозита Хит-Аg5, представляющая собой «ядро (наночастица Ag^0) – оболочка (хитозан)», и концентрация, используемая в варианте В8, оказывает наиболее значительное изменение активности антиоксидантных ферментов микроклонов картофеля. В то время как в вариантах нанокompозита Хит-Аg4, где наночастицы серебра собраны в сферические погруженные в хитозан агрегаты, прослеживается тенденция снижению антиоксидантной активности с уменьшением концентраций серебра и хитозана.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б24М-006).

Библиографические ссылки

1. Chitosan-capped silver nanoparticles: A comprehensive study of polymer molecular weight effect on the reaction kinetic, physicochemical properties, and synergetic antibacterial potential / V. Kulikouskaya, K. Hileuskaya, A. Kraskouski, I. Kozerozhets, E. Stepanova, I. Kuzminski, L. You, V. Agabekov // SPE Polym, 2022. – Vol. 3(2). – P. 77. Doi: 10.1002/pls2.10069.

2. Gowda, S. Green synthesis of chitosan silver nanocomposites and their antifungal activity against *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose in chillies / S. Gowda, S. Sri-ram // Plant Nano Biology, 2023. – Vol. 5. – P. 10041. Doi: 10.1016/j.plana.2023.100041.

3. Vasilkevich, V. M. Silver nanoparticles stabilized with a chitosan shell: physical-chemical properties and features of the toxic effect *in vivo* / V. M. Vasilkevich, R. V. Bogdanov, K. S. Hileuskaya, V. I. Kulikouskaya, E. A. Stepanova, I. I. Kuzminski // Nanobiotechnology Reports, 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 133–141. Doi: 10.1134/S2635167623010172.

Системно-биологический подход к изучению адаптации растений к дефициту кислорода и последующему окислительному стрессу

Емельянов В. В.^{А*}

^А *Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия. *E-mail: bootika@mail.ru*

Выяснение механизмов адаптации растительных организмов к изменяющимся условиям среды обитания является важной проблемой современной биологии. Растения являются облигатными аэробами. Тем не менее, часто они могут оказаться в среде с пониженной концентрацией кислорода (гипоксия) или его полным отсутствием (аноксия). От дефицита кислорода нередко страдают посевы озимых культур в зимне-весенний или осенний периоды. Гипоксия возникает также при весенних паводках и в период летней вегетации от выпадения обильных осадков. В этих условиях посадки культурных растений часто страдают от кислородной недостаточности. Согласно Всемирной продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, среднемировые потери урожая от гипоксии и аноксии составляют от 15 до 50% в год. Растения природных сообществ, обитающие в условиях постоянного переувлажнения или непосредственно в водной среде, также сталкиваются с проблемой недостатка кислорода. В естественной среде обитания вслед за периодом кислородной недостаточности обычно следует восстановление аэробных условий, и растения оказываются в условиях постаноксического окислительного воздействия, которое может способствовать гибели растения даже в том случае, если оно пережило условия аноксии. Поэтому изучение механизмов приспособления растений к условиям кислородной недостаточности и последующей реаэрации представляется важным как для выяснения теоретических основ биологии растений, так и для решения проблем сельского хозяйства с целью снижения потерь урожая и уменьшения неблагоприятного антропогенного воздействия на флору.

Способность адаптироваться к кислородной недостаточности связана с наличием различных морфогенетических, морфологических, физиологических и биохимических приспособлений, многие из которых опосредованы существенными изменениями обмена веществ при аноксии и реаэрации. Эти изменения позволяют устойчивым растениям вырабатывать достаточное количество энергии, поддерживать водное и минеральное питание и даже расти в дефицитной по кислороду среде [1]. Большинство знаний о метаболических перестройках при гипоксии/аноксии получены методами конвенциональной биохимии, когда целевым способом изучалось содержание того или иного метаболита, белка или их конкретной группы.

В подобной ситуации за рамками исследования могут оказаться существенные изменения уровня других соединений, которые не были изначальной целью анализа. Для решения этих проблем в настоящее время применяются методы системной биологии, в частности, метаболомики и протеомики.

Метаболическое профилирование с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии выявило значительные изменения в метаболомах исследованных растений при недостатке кислорода. В метаболитном спектре, как корней, так и побегов были идентифицированы все основные группы веществ центрального метаболизма. Наиболее широко были представлены сахара. Анализ разных режимов аэрации выявил межвидовые различия метаболических профилей пшеницы (неустойчивое растение) и риса (устойчивое растение), а также различия биохимических перестроек разных органов при действии аноксии. В проростках пшеницы наиболее существенные изменения происходили в интервале 6-24 ч, а у риса — через 3-6 ч воздействия. Показано значительное снижение уровня сахаров (в первую очередь олигосахаридов, гексоз и сахарофосфатов), аккумуляция метаболитов гликолиза (глицерата, пирувата) и брожений (лактат), что отражает стимуляцию анаэробного обмена. На разных этапах действия аноксии накапливались глицерин, шикимат, сукцинат и фумарат, а также аминокислоты, в т.ч. стрессовые метаболиты (аланин, γ -аминомасляная кислота [ГАМК] и пролин). Сукцинат и глицерин, также как ГАМК и аланин, являются важными анаэробными интермедиатами, образующимися в результате активации альтернативных брожениям анаэробных путей реокисления НАД(Ф)Н [1, 2]. Эти метаболиты менее токсичны для клетки, чем продукты брожений — лактат, ацетальдегид и этанол. Они позволяют поддерживать пул окисленного НАД(Ф)⁺, необходимого для протекания гликолиза. Для риса при аноксии характерно большее накопление стеридов, жирных кислот, глицерина, аминокислот (включая ГАМК), сахарофосфатов и карбоксилатов (шикимата, цитрата, малата, сукцината и фумарата). Пшеница отличалась повышенным уровнем аконитата, глицерата, лактата и диаминов. Впервые выявлено значительное накопление в анаэробном метаболоме пшеницы органических гидроксикислот (2-гидрокси-глутарата, 3-гидроксипропионата, 3- и 4-гидроксibuтирата), которые также формируются в реакциях реокисления НАД(Ф)Н. Однако, в отличие от аминокислот, они вместе с лактатом могут вносить суммарный вклад в закисление цитозоля. По-видимому, у пшеницы преобладают гликолиз и молочнокислое брожение, тогда как у риса — анаэробные пути реокисления НАД(Ф)Н, приводящие к обращению дикарбоновой части цикла Кребса, синтезу шикимата, глицерина, функционированию

ГАМК-шунта и постепенной стимуляции липидного обмена, достигающего максимума при продолжительном действии аноксии.

Сходные с рисом изменения метаболома были продемонстрированы и для дикорастущих растений-гидрофитов, обитающих в условиях дефицита кислорода. Метаболомное профилирование проводили в листьях близкородственных пар видов, из которых один — представитель гидрофитной флоры, а другой — неустойчивый к затоплению мезофит, обитающий в условиях нормоксии. Проанализировано более 50 видов растений. Метаболические профили листьев насчитывали от 100 до 400 метаболитов представляющих основные группы веществ центрального метаболизма. Виды гидрофитов, обитающие в условиях переувлажнения или затопления, накапливали аминокислоты, в том числе образованные из интермедиатов гликолиза, пролин и метаболиты ГАМК-шунта (аланин, глутамат, ГАМК, 4-гидроксипиревинат), глицерин, карбоновые кислоты цикла Кребса (фумарат и сукцинат), гликолиза (глицерат, пируват) и брожений (лактат), то есть проявляли характерные черты анаэробного метаболизма [2]. Наиболее важной группой метаболитов были карбоксилаты: сукцинат, фумарат, пируват, гликолат и лактат. Их уровень был низким у большинства мезофитов и повышенным у большинства гидрофитов. Однако, ряд гидрофитов, таких как рдесты и некоторые болотные вересковые (*Empetrum nigrum* и *Ledum palustre*) отличались пониженным уровнем этих веществ. На примере видов *Ranunculus* показано, что профилирование центрального метаболома позволяет выявлять родственные связи и, наряду с классическими методами вычислительной филогенетики, использующей молекулярно-генетические методы, может быть востребовано при построении филогенетических дендрограмм. Следует заметить, что в предшествующих хемотаксономических исследованиях изучали преимущественно вторичные метаболиты.

Поскольку возвращение условий нормальной аэрации — компонент воздействия гипо/аноксии в природных экосистемах [3], мы изучали его эффекты на метаболомы проростков пшеницы и риса. Краткосрочная (1 ч) реаэрация почти не оказывала действия на метаболомы обоих растений, которые кластеризовались вместе с аноксическими, особенно при продолжительных сроках предшествующей аноксии. 24 ч реаэрация сдвигала метаболом в сторону нормы, особенно у риса после 6 ч аноксии, однако полного возвращения не происходило. Большая отзывчивость после 6 ч бескислородного воздействия могла быть связана с тем, что в этот период переход к более позднему анаэробному ответу ещё окончательно не завершён и было возможно частичное возвращение метаболизма к дострессовому состоянию. После 24 и 72 ч бескислородного воздействия постановок

сические метаболиты группировались с аноксическими. У пшеницы реаэрация приводила к повышению уровня сахаров, карбоксилатов (включая аскорбат и лактат), глицерина и аминов. Представленность цитрата, аминокислот, азотистых оснований и жирных кислот, наоборот, снижалась. У риса реаэрация вызывала аккумуляцию гексозофосфатов, сахарозы, аминокислот, стероидов и жирных кислот, тогда как уровни карбоксилатов, как интермедиатов гликолиза и брожений (пируват, лактат), так и цикла Кребса (сукцинат, малат), пентоз и гексоз понижались. Реаэрация приводила к понижению уровней аланина и ГАМК и аккумуляции аспартата и глутамата, что указывает на сдвиги метаболизма к дострессовому состоянию. Накопление 5-оксопролина и малоната может свидетельствовать об усилении окислительного стресса при действии постаноксии.

Окислительный стресс является главным компонентом постаноксического воздействия [3]. При реаэрации продукция пероксида водорода, перекисное окисление липидов и карбонилирование белков у пшеницы стимулировались в большей степени, чем у риса. Под влиянием аноксии и реаэрации у риса наблюдалось быстрое повышение активности каталазы, а также внутри- и внеклеточных гваяколпероксидаз. Ферменты аскорбат-глутатионового цикла также эффективно функционировали у риса в условиях постаноксии. У пшеницы стимуляции каталазы не происходило, а пероксидаза активировалась только в побегах после краткосрочной аноксии и продолжительной реаэрации. Ферменты аскорбат-глутатионового цикла инактивировались. Стимуляция антиоксидантных ферментов у риса сопровождалась усилением экспрессии соответствующих генов.

Протеомный анализ методами двумерной гелевой протеомики с последующим трипсинолизом и MALDI-TOF-масс-спектрометрией выявил в проростках риса 82 аннотированных белка, из них 13 уникальных белков в побегах и 8 — в корнях. Характер изменений отдельных белков позволил выделить 4 группы с различной динамикой. В первой группе были белки, содержание которых уменьшалось в стрессовых условиях, такие как малая субъединица РубисКО, фруктозо-бисфосфат-альдолаза и ряд других ферментов фотосинтеза. Во второй группе были белки, активируемые при аноксии, среди которых — большая субъединица РубисКО, БТШ70 и PR-b1 белок (pathogenesis-related protein). Наиболее интересной является третья группа белков, накопление которых начиналось при аноксии и достигало пика во время реаэрации. К таковым относились ОЕЕ1 и 2 (oxygen-evolving enhancer proteins 1&2), малые БТШ и PR-белки, связанные с защитой от окислительного стресса и патогенов. Кроме того, промоторы генов, кодирующих эти белки, были обогащены сайтами посадки транскрипционных факторов, связанных со стрессом, в частности, WRKY,

ERF и MYB. Четвёртую группу составляли белки, уровень которых снижался при аноксии и снова возрастал при реэрации, в частности, пероксиредоксин и арабиназа. Весьма любопытно, что не было выявлено белков, специфичных только для постаноксии. Более того, так же, как и в случае метаболомов, протеом после 24 ч аноксии кластеризовался по результатам анализа методом главных компонент вместе с постаноксическим (24 ч), но не с нормоксическим протеомом. Результаты метаболомного и протеомного анализа позволяют заключить, что постаноксия не является самостоятельным стрессором, и её следует считать продолжением воздействия (последствием) аноксии. Растения, устойчивые к дефициту кислорода, обладают устойчивостью и к постаноксическому окислительному воздействию.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 18-04-00157) и РНФ (проект № 22-24-00484). Участие в симпозиуме поддержано Санкт-Петербургским государственным университетом (грант на исходящую академическую мобильность СПбГУ CONF2024_2 ID: 120787805).

Библиографические ссылки

1. Chirkova T., Yemelyanov V. The study of plant adaptation to oxygen deficiency in Saint Petersburg University. *Biol. Commun.* 2018. 63(1):17–31. doi: 10.21638/spbu03.2018.104
2. Yemelyanov V.V., Puzanskiy R.K., Shishova M.F. Plant life with and without oxygen: A metabolomics approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24(22):16222. doi: 10.3390/ijms242216222
3. Shikov A.E., Chirkova T.V., Yemelyanov V.V. Post-anoxia in plants: reasons, consequences, and possible mechanisms. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. 67(1):45–59. doi: 10.1134/S1021443720010203

Дифференциальная экспрессия генов стрессового ответа в лишайнике *Xanthoria parietina* при дегидратации и регидратации

Ефремова Д. А.^{А,Б}, Лексин И. Ю.^А, Минибаева Ф. В.^{А*}

^А Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия;

^Б Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

*E-mail: fminibayeva@gmail.com

Лишайник – симбиотическая ассоциация, основными компонентами которой являются фотобионт и микобионт. Лишайники относят к экстремофилам благодаря их способности выживать в условиях, крайне неблагоприятных для большинства других организмов. В частности, они обладают высокой устойчивостью к обезвоживанию. Механизмы устойчиво-

сти лишайников, направленные на обезвреживание активных форм кислорода и предотвращение быстрой потери воды, регулируются на уровне экспрессии генов. В настоящей работе был проведен анализ экспрессии генов стрессового ответа при обезвоживании лишайника *Xanthoria parietina*. Продукты этих генов участвуют в антиоксидантной защите, обладают осмочувствительностью или входят в процесс синтеза пигмента париетина.

Обезвоживание гидратированного лишайника проводилось в эксикаторе над перенасыщенным раствором CaCl_2 . В ходе эксперимента был произведен расчет относительного содержания воды (ОСВ) по изменениям массы талломов. Для выделения РНК и последующего синтеза кДНК были отобраны следующие образцы талломов: гидратированный контроль, талломы после обезвоживания в течение 5 ч и 17 ч и регидратации в течение 1 ч. Анализ уровня экспрессии генов был проведен методом ПЦР реального времени.

В ходе эксперимента уровень ОСВ в талломах *X. parietina* снизился до 46% через 5 ч обезвоживания и до 7% через 17 ч обезвоживания, а после регидратации этот показатель восстановился до 91%. По результатам количественной ПЦР было отмечено значительное повышение экспрессии гена белка гидрофобина, который способен образовывать на поверхности микобионта и фотобионта водонепроницаемый слой. Вместе с этим увеличилась экспрессия генов ферментов, участвующих в антиоксидантной защите: каталазы, глутаредоксина, супероксиддисмутазы и метионин-сульфоксидредуктазы. Среди генов, соответствующих осмочувствительным белкам, было отмечено повышение уровня экспрессии гена осмосенсорной протеинкиназы *srk1*. Повышение уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты начальных этапов биосинтеза париетина, может свидетельствовать о том, что при обезвоживании происходит активация синтеза предшественников этого пигмента, относящихся к группе антрахинонов. Как известно, антрахиноны обладают антиоксидантной активностью.

При помощи методов биоинформатического анализа была предсказана аннотация исследуемых генов и клеточная локализация соответствующих белков. С использованием программы antiSMASH (Blin *et al.*, 2021) нами было предсказано наличие в лишайнике *X. parietina* генного кластера биосинтеза париетина. Интересно, что в состав этого генного кластера входит белок-транспортер, обнаруженный в недавней работе Llewellyn *et al.* (2023) и не свойственный большинству генных кластеров биосинтеза производных эмодина, в число которых входит и париетин.

Наши результаты позволяют предположить, что обезвоживание лишайника *X. parietina* активирует механизмы регуляции генов, кодирую-

щих белки, такие как гидрофобин, осморегуляторные белки, ферменты антиоксидантной защиты и биосинтеза фенольных соединений, обладающих антиоксидантной активностью. Таким образом, в ответ на обезвоживание в лишайнике *X. parietina* активируется широкий спектр генов, вовлеченных в защитные механизмы.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-14-00327 и в рамках выполнения госзадания КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Библиографические ссылки

1. Blin, K. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities [Text] / K. Blin, S. Shaw, A. M. Kloosterman, Z. Charlop-Powers, V. G. P. Wezel, M. H. Medema, T. Weber // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – V.49. – P. 29-35.

2. Llewellyn, T. Metagenomics shines light on the evolution of “sunscreen” pigment metabolism in the *Teloschistales* (lichen-forming Ascomycota) [Text] / T. Llewellyn, R.W. Nowell, A. Aptroot, M. Temina, T.A. Prescott, T.G. Barraclough, E. Gaya // *Genome Biology and Evolution*. – 2023. – V. 15. – P. evad002.

Антиоксиданты повышают устойчивость растений к стрессовым воздействиям

Жигачева И.В.^{А*}, Крикунова Н.И.^А, Миль Е.М.^А, Генерозова И.П.^Б, Буцанец П.А.^Б

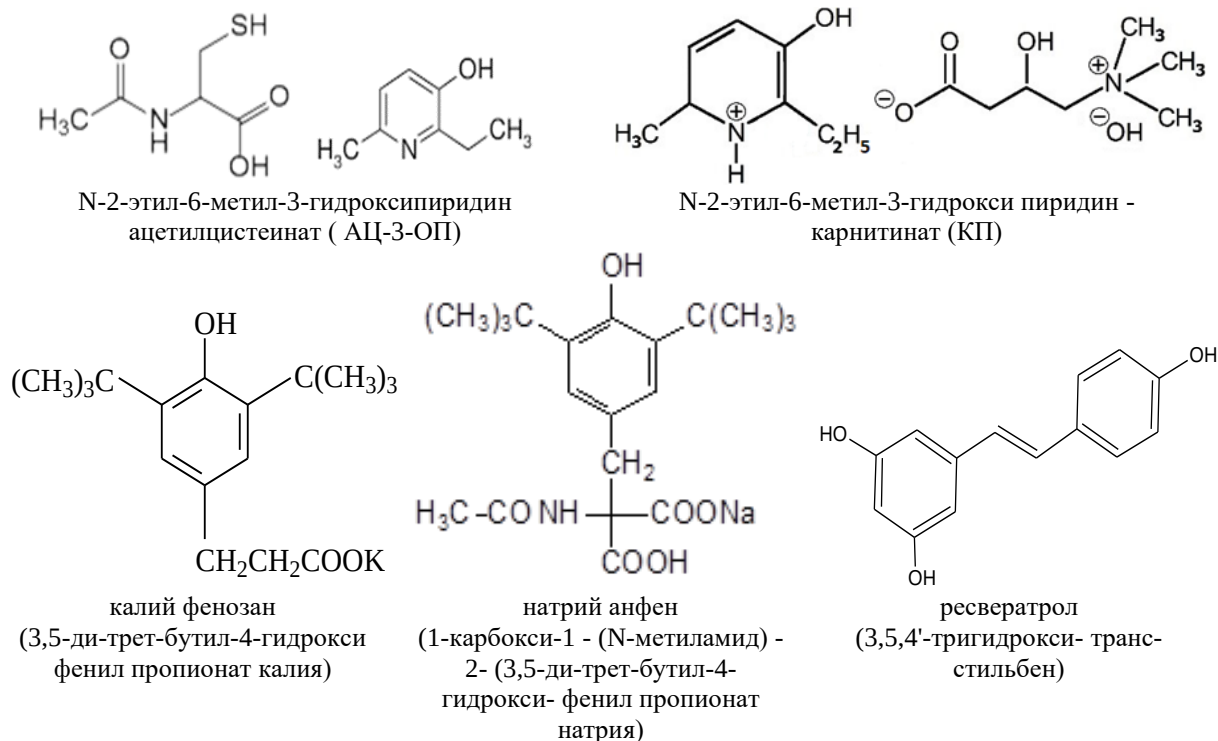
^А Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4, Факс: +7 (499) 137- 41-07. *E-mail: zhigacheva@mail.ru

^Б Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Митохондрии являются основным источником активных форм кислорода (АФК) в клетках. В физиологических условиях приблизительно 1-3% потребляемого митохондриями кислорода в результате его неполного восстановления образует АФК, которые выполняют функцию сигнальных молекул, регулирующих рост и развитие растений [1]. В норме стационарный уровень АФК в органах и тканях довольно низок (около 10^{-10} М) за счет наличия в них ферментативной и неферментативной систем, контролирующих продукцию и утилизацию этих интермедиатов. Избыток свободных радикалов связан со стрессовыми воздействиями, вызывающими смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения генерации АФК, которые в зависимости от силы стрессового воздействия могут служить индукторами процессов адаптации, либо вы-

зывать нарушение метаболизма клетки [2]. Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидов мембран митохондрий, приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Под действием АФК в АТФ/АДФ-антипортере происходит окисление SH-группы Cys-56, что приводит к открытию поры неспецифической проницаемости митохондрий ("permeability transition pore" (РТР) [3]. При этом нарушается осмотический баланс между матриксом и межмембранным пространством этих органелл. В результате происходит набухание митохондрий, выход цитохрома С и, возможно, индукция апоптоза.

В связи с этим мы предположили, что антиоксиданты, снижая содержание АФК в клетке, а, следовательно, и интенсивность ПОЛ, могут играть роль адаптогенов, повышая устойчивость растений к действию стрессовых факторов. Объектом исследования были выбраны антиоксиданты производные 3-оксипиридинов: N- 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин ацетилцистеинат (АЦ-3-ОП), N-2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин карнитинат (КП); антиоксиданты из класса пространственно затрудненных фенолов: калий фенозан (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил пропионат калия) (ФЕН), натрий анфен (1-карбокси-1 - (N-метиламид) - 2- (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил пропионат натрия) (АНФ) и природный антиоксидант –ресвератрол (3,5,4'-тригидрокси-транс-стильбен) (РВ).



Целью исследования - изучение эффектов исследуемых антиоксидантов на функциональное состояние митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды.

Исследования проводили, используя митохондрии этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Флора-2. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором KMnO_4 . Контрольную группу семян в течение 1 часа замачивали в воде, а опытную группу – в растворе исследуемых антиоксидантов (АО) (соответствующей концентрации). Затем семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. Спустя сутки половину семян контрольной группы (ДВ) и семена, обработанные АО, на 2 суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Затем семена группы ДВ переносили на влажную фильтровальную бумагу, а семена опытной группы - на фильтровальную бумагу, увлажненную исследуемыми АО, где семена обеих групп находились в течение последующих 2 суток. Семена контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования (при 25000 g в течение 5 мин и при 3000 g в течение 3 мин) [4]. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 0,1% БСА (свободный от жирных кислот) и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

Скорости дыхания митохондрий проростков гороха регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий печени содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Tris -буфер (pH 7,2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ MgCl_2 , и 0,1% БСА. Перекисное окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [5]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvonGmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

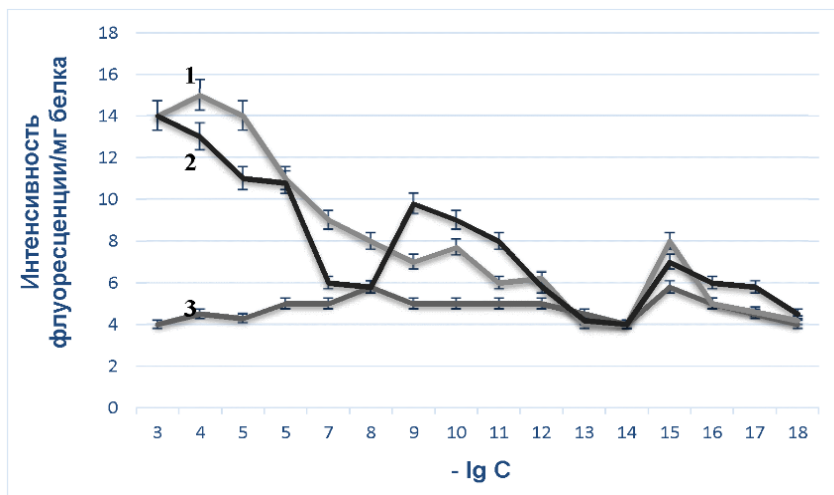
Для активации ПОЛ выделенные митохондрии (2-3 мг белка) помещали в 0,5 мл среды, содержащей 85мМ KCl , 10 мМ HEPES и 1мМ KH_2PO_4 , pH 7,4. Митохондрии инкубировали 20-25 мин при комнатной температуре. В эксперименте использовали реактивы фирм: сахароза,

Трис, ЭДТА, FCCP, АДФ, малат, глутамат (“Sigma Aldrich,” США); БСА, (свободный от ЖК) (“Sigma Aldrich,” США); НЕРЕС (“MP Biomedicals”, Германия), метанол, хлороформ (Merck, Германия).

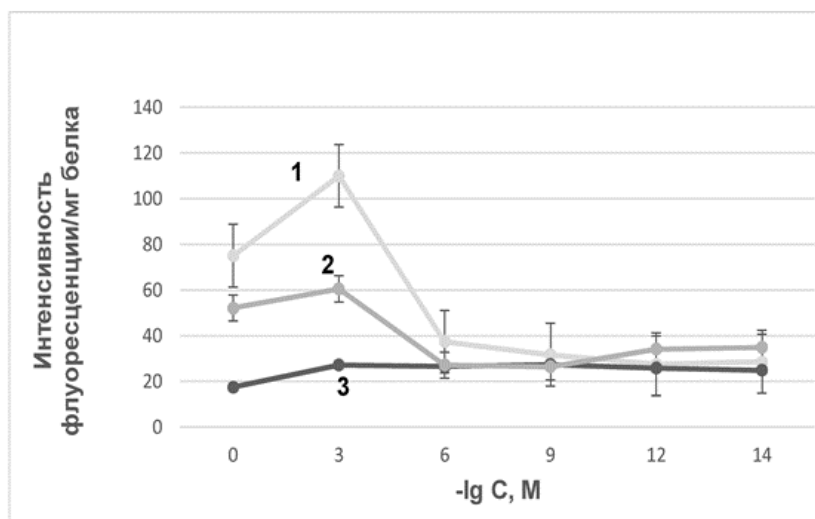
Инкубация митохондрий в гипотоническом солевом растворе вызывала слабое набухание митохондрий и рост генерации АФК, что нашло отражение в увеличении интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в 3-4 раза (рис. 1). Введение исследуемых антиоксидантов в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и носило дозовую зависимость. Калий фенозан в концентрации 10^{-7} - 10^{-8} М и 10^{-12} - 10^{-14} М снижал интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха почти до контрольных значений. Натрий анфен эффективно понижал интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в концентрациях 10^{-11} - 10^{-14} М. Эффективными концентрациями для АЦ-3-ОП и КП были 10^{-6} - 10^{-14} М. И, наконец, РВ предотвращал активацию ПОЛ в концентрационном интервале 10^{-5} - 10^{-14} М. Предупреждение активации ПОЛ исследуемыми АО, вероятно, указывало на наличие у них антистрессовых свойств.

Наличие этих свойств у исследуемых АО мы проверили на модели дефицита воды. При этом использовали АО в концентрациях, предотвращающих активацию ПОЛ. Наличие этих свойств у исследуемых АО мы проверили на модели дефицита воды. При этом использовали ФЕН в концентрации 10^{-8} М и АНФ в концентрации 10^{-13} М, АЦ-3-ОП и КП - в концентрации 10^{-9} М, РВ - в концентрации 10^{-5} М. Дефицит воды приводил к активации свободно радикального окисления в мембранах митохондрий проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Отметим, что обработка семян гороха АО вызывала снижение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ (рис. 2).

a



б



в

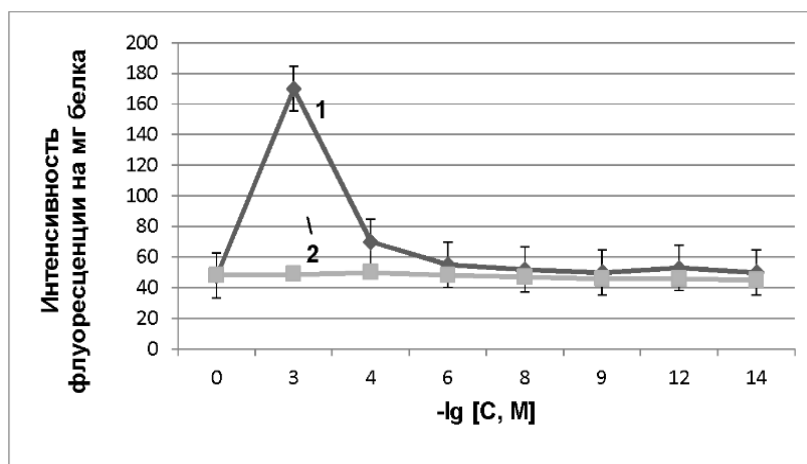
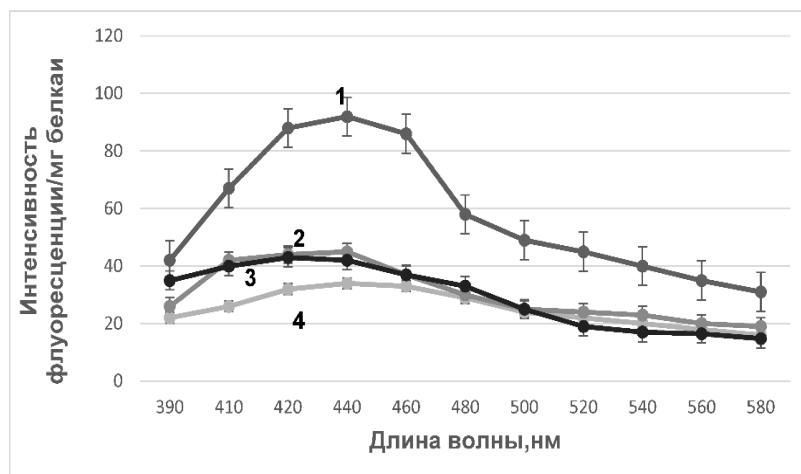
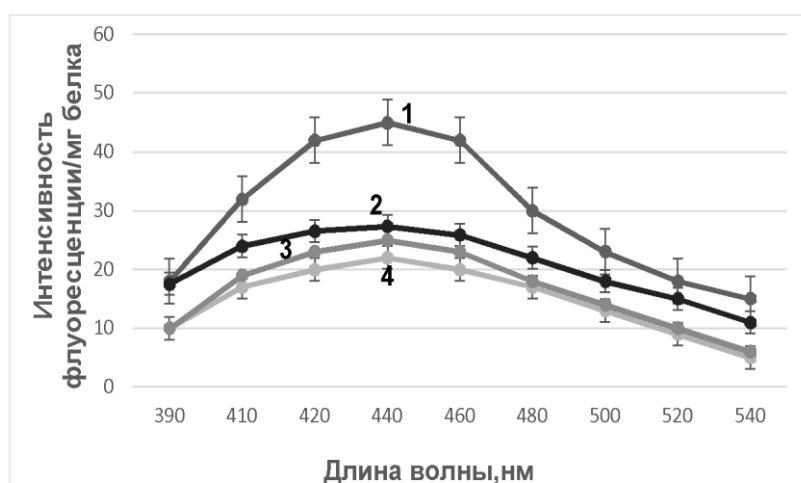


Рис 1. Влияние различных концентраций антиоксидантов (АО) и «старения» митохондрий на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ:
a – 1- «старение» митохондрий + натрия анфен (АНФ); 2- «старение» митохондрий + калия фенозан (ФЕН) 3- контроль; *б* – 1- «старение» митохондрий + АЦ-3-ОП; 2-«старение» митохондрий +КП; 3-контроль; *в* – 1- РВ; 2-контроль.

a



б



в

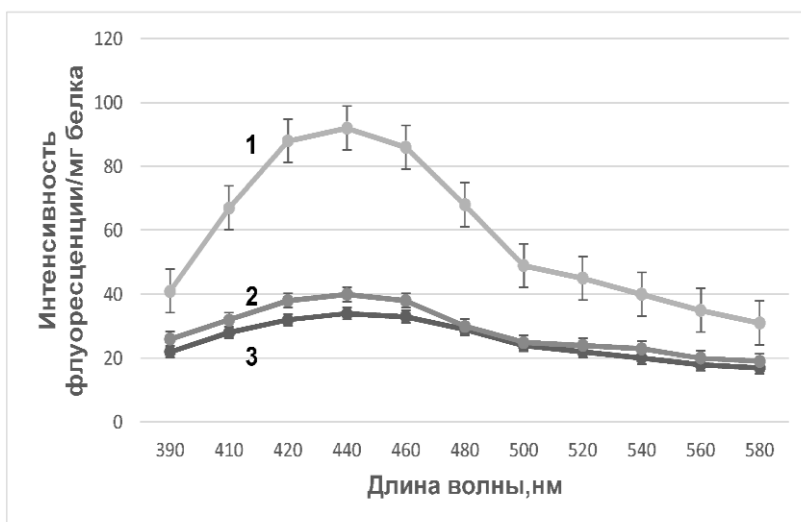


Рис. 2. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий 5-дневных этилированных проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ) и обработки семян АО:

a – 1- ДВ; 2 - ДВ+АНФ; 3 - ДВ+ФЕН; 4 – контроль; *б* – 1-ДВ; 2 – ДВ+АЦ; 3 - ДВ + КП; 4 – контроль; *в* – 1 - ДВ; 2 - ДВ+РВ; 3 –контроль

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий в условия дефицита воды сопровождались 30% снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 25% снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Обработка семян и проростков гороха АО в концентрациях, предотвращающих активацию ПОЛ, способствовала сохранению эффективности окислительного фосфорилирования и поддержанию высоких скоростей окисления НАД-зависимых субстратов.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, приводящие к изменениям в энергетическом метаболизме, отразилось и на физиологических показателях, а именно, на росте проростков. Дефицит воды резко снижал ростовые процессы. Обработка семян и проростков гороха используемыми концентрациями антиоксидантов предотвращала угнетение роста корней и побегов.

Адаптогенные свойства исследуемых антиоксидантов, вероятно, могут быть обусловлены их антиоксидантной активностью. Предотвращая пероксидацию фосфолипидов, исследуемые антиоксиданты, по-видимому, обеспечивали эффективную работу электрон-транспортных цепей митохондрий. Это, вероятно, определяло устойчивость проростков к действию стрессовых факторов.

Библиографические ссылки

1. Schieber M., Chandel N. S. *Current Biology*. 2014, 24 (10), R453-R462 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.
2. Javadov S., Karmazyn M. *Cell Physiol Biochem*. 2007, 20(1-4), 1-22 doi :10.1159/000103747.
3. Новодережкина Е.А., Животовский Б. Д., Гогвадзе В. Г. Молекулярная биология. 2016, 50 (1), 51–68 doi: 10.7868/S002689841601016X.
4. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. *Anal. Biochem*. 1973, 52, 1–9 doi: 10.1016/0003-2697(73)90327-8.

Влияние прайминга семян на скорость окислительных процессов и активность пероксидазы в проростках пшеницы в условиях засоления

Жук Е. А.^А, Филиппова Г. Г.^{А*}

^А *Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: filiptsova@bsu.by*

Прайминг семян представляет собой метод контролируемых циклов гидратации и обезвоживания семян перед посевом, при котором активи-

руются метаболические процессы, связанные с прорастанием, но не инициируется появление корешков. Прайминг улучшает всхожесть семян, стимулирует рост проростков, их стрессоустойчивость и, как следствие, способствует повышению урожайности сельскохозяйственных растений при действии неблагоприятных факторов среды [1]. Показано, что при праймировании происходит ряд биохимических изменений, таких как активация гидролитических ферментов, увеличение соотношения АТФ/АДФ, синтез стимуляторов роста и ряда защитных соединений, способствующих восстановлению поврежденных клеток, в том числе репарации ДНК [2]. Одним из ключевых процессов, индуцируемых при прайминге семян, является поддержание баланса между генерацией и дезактивацией активных форм кислорода (АФК) вследствие активации антиоксидантных ферментов, таких как пероксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза [3].

В зависимости от применяемых агентов выделяют несколько типов прайминга: гидропрайминг, осмопрайминг, галопрайминг, гормональный прайминг и биопрайминг. Все они направлены на повышение качества всходов и адаптацию растений к изменяющимся внешним факторам. Вместе с тем эффективность праймирования зависит от множества факторов, таких как вид растения, состояние семян, метод и время праймирования, внешние факторы. Целью данной работы было исследование влияния различных видов прайминга на активность пероксидазы и скорость окислительных процессов в проростках пшеницы в условиях повышенной концентрации (50 мМ) NaCl в среде. В качестве прайминг-агентов использовались водные растворы KCl (0,1 М), NaCl (0,1 М), KNO₃ (0,1 М), ПЭГ (20%), контроль – дистиллированная вода.

Известно, что повышенная концентрация хлорида натрия в среде приводит к замедлению поступления воды и развитию осмотического стресса, изменению ионного гомеостаза в клетках и возникновению токсического эффекта ионов натрия, а также развитию окислительного стресса вследствие увеличения скорости образования АФК [4].

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что в условиях засоления предпосевная обработка семян растворами KCl, KNO₃ и ПЭГ стимулирует начальные этапы роста и способствует увеличению массы корней и побегов проростков пшеницы. Наблюдаемый защитный эффект прайминг-агентов может быть связан с повышением устойчивости растений к осмотическому стрессу, а также модификацией редокс-статуса клеток. Показано, что в условиях засоления обработанные прайминг-агентами проростки характеризуются более низкой скоростью окислительных процессов по сравнению с необработанным вариантом. Согласно полу-

ченным результатам прайминг семян растворами KCl, KNO₃ и ПЭГ приводит к уменьшению уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в корнях проростков на 21%, 15% и 39% соответственно. Анализ активности пероксидазы в побегах и корнях опытных проростков показал, что прайминг-агенты оказывают различное влияние на активность данного фермента. Наиболее значительное увеличение активности пероксидазы наблюдается при обработке семян KNO₃ и NaCl, тогда как использование ПЭГ приводит к снижению активности этого фермента в корнях проростков. Следовательно, в проведенных исследованиях не установлено прямой зависимости между уровнем продуктов ПОЛ и активностью пероксидазы.

Библиографические ссылки

1. McDonald, M.B. Seed priming. Seed technology and its biological basis / Sheffield: Sheffield Academic Press. – 2000. P. 287-325.
2. Chatterjee, N. [et al.] On-farm seed priming intervention in agronomic crops // Acta Agric. Slov. – 2018. V. 111. – P. 715-735.
3. Wojtyla, L. [et al.] Molecular processes induced in primed seeds – increasing the potential to stabilize crop yields under drought conditions / J Plant Physiol. – 2016. V. 203. – P. 116-126.
4. Chele, K. Soil Salinity, a Serious Environmental Issue and Plant Responses: A Metabolomics Perspective / K. Chele, M. M. Tinte, L. A. Piater et. al. // Metabolites. – 2021. V. 11. – P. 724-743.

Фенольные антиоксиданты и их роль в адаптации растений к стрессовым воздействиям

Загоскина Н. В.^{A*}, Зубова М. Ю.^A

^A Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия

**E-mail: nzagoskina@mail.ru*

Фенольные соединения (ФС) это одни из наиболее распространенных в растениях вторичных метаболитов, которые синтезируются практически во всех клетках [1]. Их спектр чрезвычайно широк, представлен различными классами и насчитывает более 10000 соединений [2]. Известна важная роль ФС в регуляции роста, репродуктивных процессов, фотосинтеза, дыхания, а также устойчивости к стрессовым воздействиям (УФ-радиация, температура, патогены, механические воздействия и др.) [3,4]. ФС представляют собой одни из эффективных биоантиоксидантов, которые, взаимодействуя с активными формами кислорода (АФК), ингибируют процессы перекисного окисления липидов и снижают уровень окис-

лительного стресса в растительных клетках [5]. Антиоксидантная активность ФС даже может превышать таковую аскорбиновой кислоты и токоферола – наиболее известных представителей этого класса веществ [6]. Следует отметить, что при поступлении в организм человека по пищевым цепям она сохраняется, что имеет важное значение для здоровьесбережения населения [7].

Благодаря своим свойствам, ФС находят все более широкое применение в различных отраслях народного хозяйства – пищевой, фармацевтической и косметологической промышленности, а также в сельском хозяйстве в качестве регуляторов роста растений. Их действие в значительной степени определяется структурой соединения, в частности наличием и расположением оксигрупп и их заместителей в молекуле, а также концентрацией, растворимостью, устойчивостью к эндогенным воздействиям и другими параметрами [8].

В настоящее время достигнуты значительные успехи в изучении биосинтеза ФС; известны практически все гены, ответственные за их превращения; имеется информация о трансфакторах и их регуляции [9]. Большое внимание уделяется изучению возможностей повышения продукционной способности растительных клеток и тканей в отношении накопления этих вторичных метаболитов, их компартментации, способов и методов экстракции и анализа [10]. Высказывается тезис о том, что ФС могут выполнять функции редокс-регуляторов в растениях, что имеет важное значение в силу их «прикрепленного» образа жизни и необходимости «приспосабливаться» к различным условиям окружающей среды.

Следует также отметить значительное число публикаций о функциональной активности различных ФС в организме человека, их превращениях и «доступности» как растительных биоантиоксидантов [11, 12]. Эти исследования особенно значимы для здоровьесбережения населения. Все вышеизложенное свидетельствует о важной роли фенольных биоантиоксидантов не только в жизнедеятельности и устойчивости растений, но и человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-24-00359.

Библиографические ссылки

1. Kołton A., Długosz-Grochowska O., Wojciechowska R., Czaja M. Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. *Sci. Hortic.* 2022, 291, 110561.
2. Zagorskina N.V., Zubova M.U., Nechaeva T.L., Kazantseva V.V., Goncharuk E.A., Katanskaya V.M., Baranova E.N., Aksenova M.A. Polyphenols in plants: Structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13874.
3. Singh S., Kaur I., Kariyat R. The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(3), 1442.

4. Šamec D., Karalija E., Šola I., Vujčić Bok V., Salopek-Sondi B. The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*. 2021, 10(1), 118.
5. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch. Toxicol.* 2020, 94, 651–715.
6. Sytařová I., Orsavová J., Snopek L., Mlček J., Byczyński Ł., Mišurcová L. Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times. *Food chemistry*. 2020, 310, 125784.
7. Samanta S. Potential bioactive components and health promotional benefits of tea (*Camellia sinensis*). *J. Am. Nutr. Assoc.* 2022, 41, 65-93.
8. Cosme P.; Rodriguez A.B.; Espino J.; Garrido M. Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants*. 2020, 9, 1263.
9. Zhang S., Zhang L., Zou H., Qiu L., Zheng Y., Yang D., Wang, Y. Effects of light on secondary metabolite biosynthesis in medicinal plants. *Front. Plant Sci.* 2021, 12, 781236.
10. López-Fernández O., Domínguez R., Pateiro M., Munekata P.E., Rocchetti G., Lorenzo J.M. Determination of polyphenols using liquid chromatography–tandem mass spectrometry technique (LC–MS/MS): A review. *Antioxidants*. 2020, 9(6), 479.
11. Maiuolo J., Gliozzi M., Carresi C., Musolino V., Oppedisano F., Scarano F., Nucera S., Scicchitano M., Bosco F., Macri R. Nutraceuticals and cancer: Potential for natural polyphenols. *Nutrients*. 2021, 13, 3834.
12. Rana A., Samtiya M., Dhewa T., Mishra V., Aluko R.E. Health benefits of polyphenols: A concise review. *J. Food Biochem.* 2022, 46(10), e14264.

Редокс-активные соединения флавановой природы с различной степенью полимеризации в *in vitro* культуре *Camellia sinensis* L. и их роль в стресс-устойчивости

Зубова М. Ю.^{А*}, Нечаева Т. Л.^А, Осипов В. И.^Б, Загоскина Н. В.^А

^А *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия. *E-mail: mariia.zubova@yandex.ru*

^Б *Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия*

Неотъемлемой составляющей жизнедеятельности растений, а также инициированных из них *in vitro* культур является образование активных форм кислорода (АФК) [1]. Они могут оказывать регуляторную и сигнальную функцию, а при значительном их накоплении приводить к развитию окислительного стресса и даже гибели клеток [2]. Его уровень может быть различным и зависит от многих факторов, включая стадии развития растений (ското- и фотоморфогенез), условия их выращивания (свет, фотопериод, интенсивность, УФ и др.) и экзогенные воздействия (температура, рН, минеральные вещества и др.) [3].

Важная роль в защите растений от действия АФК принадлежит антиоксидантной системе основными компонентами которой являются высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты [1]. К числу последних относятся такие редокс-активные вещества как фенольные соединения (ФС) [4]. Благодаря своим химическим свойствам они легко взаимодействуют с АФК, тем самым снижая их токсическое действие на клетки. Высокая антиоксидантная активность ФС служит предметом многочисленных исследований и не только специалистов в области физиологии и биохимии растений, но также медиков и фармацевтов. В значительной степени этот интерес обусловлен тем, что эти растительные биоантиоксиданты сохраняют биологическую активность при поступлении в организм человека по пищевым цепям [5].

В настоящее время ареал произрастания и численность растительных сообществ часто ограничены и даже находятся под угрозой исчезновения, что не позволяет реализовать коммерческие масштабы их применения и вызывает необходимость использования других технологических подходов при получении растительного сырья. К их числу относятся биотехнологические методы, обеспечивающие непрерывное, экономически выгодное производство для пищевой и фармакологической индустрии, а также нутрицевтической сферы [6]. И в этом случае культура клеток и тканей растений может рассматриваться в качестве основной платформы для получения вторичных метаболитов, в том числе ФС. Для нее характерны следующие преимущества: рост в контролируемых условиях; отсутствие ограничений в действии сезонных, климатических и географических факторов; сохранение способности к образованию характерных для интактных растений метаболитов и возможность модуляции их биосинтеза различными экзогенными воздействиями [7,8].

Растения чая (*Camellia sinensis* L.) являются уникальным объектом, поскольку способны накапливать фенольные биоантиоксиданты в большом количестве [9]. К их числу относятся флаваны – основные представители его фенольного комплекса, представленные мономерными (катехины) и олигомерными (проантоцианидины) формами. Именно они обуславливают ценные свойства, получаемого из чая напитка [10]. Каллусные культуры, инициированные из однолетних побегов *C. Sinensis*, сохраняют способность к образованию характерных для исходных эксплантов ФС, в том числе флаванов [11]. При этом знания об их составе и степени полимеризации крайне малы.

Целью настоящей работы стало изучение содержания и состава редокс-активных соединений фенольной природы с различной молекулярной массой (катехинов и проантоцианидинов) в каллусной культуре чайного растения.

Каллусные культуры чайного растения (*Camellia sinensis* L.) выращивали на модифицированной питательной среде Хеллера в темноте или при 16-час. фотопериоде в условиях факторостата ИФР РАН. При изучении действия тяжелых металлов к основной питательной среде добавляли $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ концентрация 2×10^{-5} М. Состав и содержание флаванов анализировали методом ВЭЖХ и масс-спектрометрии, используя 70%-ные ацетоновые экстракты лиофильно-высушенного материала [12]. Необработанные данные MS были преобразованы в формат NetCDF и обработаны с программой MetAlign [13].

Изучение фенольного комплекса каллусных культур чая показало, что флаваны были представлены 13 соединениями, включая как мономерные, так и олигомерными (проантоцианидины) метаболиты. На их долю приходилось почти 70% от всего фенольного комплекса каллусов чайного растения. При этом состав этих компонентов был одинаков, то есть не зависел от возраста культур и условий их роста (свет или темнота).

Мономерные флаваны были представлены (+)-катехином и (-)-эпикатехином. Преобладающим соединением был (-)-эпикатехин, его относительное накопление в 3-5 раз превышало таковое (+)-катехина. Кроме того, был идентифицирован гексозид (-)-эпикатехина, который впервые был обнаружен в каллусной культуре чайного растения.

Олигомерные флаваны были представлены проантоцианидинами типа Б с различной степенью полимеризации, согласно значениям m/z ионов [МН]. Это были два изомера димерной структуры, три изомера - тримерной структуры, три изомера тетрамерной структуры и два изомера – пентамерной структуры. Их относительное содержание уменьшалось в ряду $\text{ПА}2 > \text{ПА}3 > \text{ПА}4 > \text{ПА}5$. Это свидетельствует о преимущественном образовании в каллусах чая димерных форм. Таким образом, чем выше степень полимеризации флаванов, тем ниже их содержание в *in vitro* культуре, как это отмечалось и другими авторами [14]. При этом у каллусов, выращиваемых на свету накопление проантоцианидинов в среднем на 30 – 40% превышало таковое при их выращивании в темноте (за исключением пентамеров).

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что состав ФС каллусных культур чая менее разнообразен, по сравнению с таковым интактного растения, за исключением образования проантоцианидинов с более «широким» спектром полимеризации. Эти изменения в определенной степени свидетельствуют о запасании энергетического материала в виде олигомеров фенольной природы, которые могут быть использованы в качестве дополнительных источников углерода для поддержания жизнедеятельности растительных клеток, что особенно важно при стрессовых воз-

действиях. Это согласуется с нашими данными по накоплению редокс-метаболитов флавановой природы, в частности (+)-катехина, а также димеров и тетраметов проантоцианидинов типа Б при относительной стабильности уровня ПОЛ в каллусной культуре чайного растения, подвергнутой действия тяжелых металлов (в частности Cd), что подтверждает их редокс-активную роль в клетках растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-24-00359.

Библиографические ссылки

1. Meitha, K.; Pramesti, Y.; Suhandono, S. Reactive oxygen species and antioxidants in postharvest vegetables and fruits. *Int. J. Food Sci.* 2020, 8817778. <https://doi.org/10.1155/2020/8817778>
2. Ali, S.; Tyagi, A.; Bae, H. ROS interplay between plant growth and stress biology: Challenges and future perspectives. *Plant Physiol. Biochem.* 2023, 203, 108032. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108032>
3. Singh, A.K.; Dhanapal, S.; Yadav, B.S. The dynamic responses of plant physiology and metabolism during environmental stress progression. *Mol. Biol. Rep.* 2020, 47, 1459–1470. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05198-4>
4. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010, 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
5. Cosme, P.; Rodriguez, A. B.; Espino, J.; Garrido, M. Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants* 2020, 9, 1263. <https://doi.org/10.3390/antiox9121263>
6. Chandran, H.; Meena, M.; Barupal, T.; Sharma, K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep.* 2020, 26, e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
7. Efferth, T. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering.* 2019, 5, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
8. Wu, T.; Kerbler, S.M.; Fernie, A.R.; Zhang, Y. Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. *Plant Comm.* 2021, 2, 100235. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100235>
9. Meng, X.H.; Li, N.; Zhu, H.T.; Wang, D.; Yang, C.R.; Zhang, Y.J. Plant resources, chemical constituents, and bioactivities of tea plants from the genus *Camellia* Section Thea. *J. Agric. Food Chem.* 2018, 67, 5318–5349. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05037>
10. Samanta, S. Potential bioactive components and health promotional benefits of tea (*Camellia sinensis*). *J. Am. Nutr. Assoc.* 2022, 41, 65-93. <https://doi.org/10.1080/07315724.2020.1827082>
11. Goncharuk, E.A.; Zubova, M.Y.; Nechaeva, T.L.; Kazantseva, V.V.; Gulevich, A.A.; Baranova, E.N.; Lapshin, P.V.; Katanskaya, V.M.; Aksenova, M.A.; Zagorskina, N.V. Effects of Hydrogen Peroxide on In Vitro Cultures of Tea (*Camellia sinensis* L.) Grown in the Dark and in the Light: Morphology, Content of Malondialdehyde, and Accumulation of Various Polyphenols. *Molecules* 2022, 27, 6674. <https://doi.org/10.3390/molecules27196674>

12. Karonen, M.; Loponen, J.; Ossipov, V.; Pihlaja, K. Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2004, 522 (1), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.06.041>

13. De Vos, R.C.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J.J.; Bino, R.J.; Hall, R.D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 2007, 2 (4), 778–791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.95>

14. Fraser, K.; Harrison, S.J.; Lane, G.A.; Otter, D.E.; Hemar, Y.; Quek, S.Y.; Rasmussen, S. HPLC–MS/MS profiling of proanthocyanidins in teas: A comparative study. *J. Food Composition and Analysis.* 2012, 26(1-2), 43-51. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.01.004>

Влияние погодных условий сбора урожая сои на антиоксидантную систему её семян

**Иваченко Л. Е.^{А,Б*}, Лаврентьева С. И.^{А,Б}, Блинова А. А.^{А,Б},
Бондаренко О. Н.^Б**

^А Благовещенский государственный педагогический университет, кафедра химии,
Благовещенск, Россия, *E-mail: ivachenko-rog@yandex.ru

^Б Всероссийский научно-исследовательский институт сои, лаборатория биотехнологии,
Благовещенск, Россия.

Соя является востребованной белково-масличной культурой во всем мире. Основным регионом возделывания сои в России является Дальний Восток. Климат Амурской области резко-континентальный по температурным признакам с элементами муссонности по осадкам. Он характеризуется большим количеством солнечных дней, коротким безморозным периодом, значительными колебаниями по количеству осадков и температуре, что позволяет успешно возделывать теплолюбивую культуру сою. Главной задачей селекционеров является создание сортов сои с повышенной урожайностью и высокой приспособленностью к неблагоприятным условиям окружающей среды [1]. Установлено, что в зависимости от генотипа и условий окружающей среды в семенах сои значительно варьирует содержание и качество белка [2]. В. Т. Синеговской и соавторами выявлена тесная корреляционная взаимозависимость содержания белка в семенах сои с количеством выпавших осадков и гидротермальным коэффициентом в период образования бобов – налива семян [3]. Неблагоприятные условия выращивания индуцируют высокие концентрации активных форм кислорода (АФК), которые могут повредить внутриклеточные макромолекулы. Примерно 1% потребляемого растениями O₂ направляется на образование АФК, которые представляют собой свободные радикалы, образующиеся во время метаболизма кислорода (гидроксильный радикал

(НО[•]), пероксид водорода (H₂O₂), супероксидный радикал (O₂^{•-}) и синглетный кислород (¹O₂) [4]. Воздействие экологических факторов нарушает баланс между образованием и утилизацией АФК в клетках, что приводит к их накоплению, увеличению интенсивности перекисного окисления (ПОЛ) мембран и является одной из основных причин повреждения и гибели растений. Маркером интенсивности окислительных процессов и показателем степени повреждающего действия стресс-фактора служит накопление одного из продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) [5].

Растения хорошо приспособлены для минимизации повреждений, которые могут быть вызваны АФК в естественных условиях роста и имеют сложные защитные механизмы для выживания в различных экологических условиях. Система окислительного ответа растений, которая включает неферментативные и ферментативные реакции, участвует в нейтрализации АФК, называется антиоксидантной. Неферментативные антиоксиданты, включают аскорбиновую кислоту, токоферол, глутатион, флавоноиды, алкалоиды и каротиноиды. К ферментам-антиоксидантам относятся супероксиддисмутаза (СОД, ЕС 1.15.1.1), каталаза (КАТ, ЕС 1.11.1.6), пероксидазы (ПОД, ЕС 1.11.1.x), полифенолоксидаза (ПФО, ЕС 1.10.3.1) и другие ферменты [6]. Антиоксидантная система, может служить показателем устойчивости растений к разнообразным стрессовым факторам [7].

Цель работы – сравнить влияния погодных условий сбора урожая сои на функционирование антиоксидантной системы её семян.

Для более точной оценки антиоксидантной активности сои мы проанализировали в течение трех лет (2019-2021 гг.) семена девяти сортов сои селекции ФГБНУ ФНЦ Всероссийского научно-исследовательского института сои (Кружевница, Сентябринка, Веретейка, Лидия, Умка, Даурия, Золушка, Лазурная, Топаз). В лабораторных исследованиях удельную активность пероксидазы семян сортов сои определяли фотоколориметрическим методом, удельную активность супероксиддисмутазы, каталазы, полифенолоксидазы, содержание МДА, аскорбиновой кислоты и каротина – спектрофотометрическим методом. Для биохимического анализа из исследуемого материала (500 мг) готовили экстракты белков, в которых определяли количество белка по методу Лоури. Удельную активность ферментов выражали в единицах активности на 1 мг белка [8]. Исследования выполняли в двух биологических и трех аналитических повторностях. Обработка результатов исследования выполнена с использованием статистической программы STATISTICA 10, графическое представление данных – с помощью программного обеспечения Excel (2010).

Биохимические показатели семян сои зависят от условий окружающей среды. Метеорологические условия по годам были в целом относительно удовлетворительными для возделывания сои. Сумма активных температур была достаточной для вызревания сортов сои. Однако к избыточному увлажнению почвы, в отдельные периоды и неравномерному температурному фону сорта проявляли различную степень резистентности. Наиболее используемым показателем метеорологических исследований является гидротермический коэффициент увлажнения (ГТК) Г.Т. Селянинова, представляющий собой отношение суммы осадков за период не менее месяца к сумме температур выше 10 °С за этот же период, уменьшенной в 10 раз [9]. В исследуемые годы вегетационные периоды в целом имели незначительные отличия и по ГТК были отнесены к переувлажненным, но в период созревания семян и сбора урожая в сентябре по температуре и количеству осадков были значительные различия, что повлияло на биохимические процессы в семенах сои, собранных в разные годы исследования. В 2019 г. в сентябре ГТК соответствовал 1,3, что соответствует норме. В 2020 г. в сентябре выпало на 40% осадков больше нормы, и ГТК составил 2,9, поэтому этот период отнесен к переувлажненному. В 2021 году сентябрь отличился повышенной температурой и минимальным количеством осадков, что позволило охарактеризовать ГТК как засушливый (0,9).

Анализ средних исследуемых показателей в семенах сои за три года, позволил выявить, что в 2019 году, когда в сентябре были установлены оптимальные условия возделывания сои, антиоксидантная система работала на минимуме. В этом году в полученных семенах выявлено невысокое содержание низкомолекулярных антиоксидантов аскорбиновой кислоты и каротина (9,56 мг % и 0,11 мг на 100 г соответственно). Удельная активность антиоксидантных ферментов СОД, КАТ и ПОД также была низкой и составила 50, 04, 11,3 и 48, 83 ед/мг белка соответственно. Такие низкие показатели антиоксидантной системы в стандартных для сои условиях возделывания, вероятно, отразилось на содержании МДА в семенах сои, которое составило максимальное значение 0,29 мкмоль/г сырой массы (таблица). Следует отметить в этих условиях только самую высокую активность ПФО (8,72 ед/мг белка), что выше в 8 раз по сравнению с 2020 г. и в 15 раз по сравнению с 2021 г. Высокая удельная активность ПФО способствует утилизации избытка пероксида водорода. Фермент катализирует реакции, в которых акцептором водорода выступает молекулярный кислород воздуха, а фенолы действуют как неферментативные антиоксиданты доноров водорода, поэтому ПФО участвует в дыхании рас-

тительных клеток путем обратимого окисления полифенолов. Установлено, что в стрессовых условиях в клетке активность ферментов фенолоксидаз возрастает, препятствуя распространению АФК [10].

Наименьшее содержание МДА (0,08 мкмоль/г сырой массы) наблюдалось в 2020 году, где за весь вегетационный период, за исключением июля, было отмечено переувлажнение. В этих условиях выявлено максимальное содержание каротина (0,23 мг на 100 г) и важнейших ферментов антиоксидантного комплекса СОД и ПОД (154,7 и 107,4 ед/мг белка соответственно). Минимальное содержание МДА можно объяснить тем, что именно высокая удельная активность СОД обеспечивает важную роль в защите клеток растений от АФК. Этот фермент обнаружен практически во всех компартментах клетки, где осуществляет дисмутацию реакционно активного супероксидного анион-радикала до более стабильного пероксида водорода. Этот фермент принадлежит к наиболее интенсивно изучаемым белкам, так как он является ключевым ферментом, непосредственно обеспечивающим обрыв цепей кислород зависимых свободно радикальных реакций в клетках аэробных организмов. Также минимальное содержание МДА в условиях этого года можно объяснить благодаря наличию в структуре каротина сопряженных двойных связей, которые могут легко связывать синглетный кислород и ингибируют образование свободных радикалов, предупреждая их негативное действие на растительный организм.

Таблица

Средние показатели содержания МДА, каротина, аскорбиновой кислоты и антиоксидантных ферментов семян сои, выращенных в 2019-2021 гг.

Год	Средние показатели ПОЛ	Среднее содержание низкомолекулярных антиоксидантов		Средняя удельная активность антиоксидантных ферментов, ед/мг белка			
	МДА, мкмоль/г	Каротин, мг на 100 г	Аскорбиновая кислота, мг%	СОД	КАТ	ПОД	ПФО
2019	0,29	0,11	9,56	50,04	11,30	48,83	8,72
2020	0,08	0,23	10,20	154,70	129,34	107,74	0,58
2021	0,12	0,08	18,65	79,16	149,64	52,79	1,22

Следует заметить, что в 2021 году, когда в сентябре наблюдалась засуха, содержание МДА в семенах сои было невысоким и составило всего 0,12 мкмоль/г сырой массы. Максимальная удельная активность выявлена в этих условиях для каталазы (149,64 ед/мг белка) и установлено высокое содержание аскорбиновой кислоты (18,65 мг %), что составило в два раза выше, чем в условиях 2019 года. В утилизации образующегося в клетках растений пероксида водорода активно участвует КАТ. Важно, что КАТ

утилизирует пероксид водорода энергосберегающим образом, что способствует сохранению восстановленных эквивалентов и энергии в клетках.

В формировании защитно-приспособительной реакции растения на действия стресса вовлечены многие физиологические и биохимические процессы, в первую очередь активизируются компоненты антиоксидантной защиты.

Таким образом, показано, что в период уборки урожая сои (IX месяц), оценка погоды по ГТК отличалась: 2019 г. – норма, в 2020 г. – переувлажненный, а 2021 г. – засушливый, что оказало влияние на биохимические процессы в семенах сои, в том числе на функционировании антиоксидантного комплекса. В 2019 году, в сентябре установлены оптимальные условия возделывания сои, также в этом году отсутствовал засушливый период, что вероятно связано с минимальной активностью антиоксидантного комплекса, а поэтому максимальном содержании МДА в семенах сои, и повышенной удельной активности ПФО. В условиях 2020 году, когда за весь вегетационный период отмечено переувлажнение, за исключением июля, в семенах сои установлена максимальная активность антиоксидантных ферментов и высокое содержание каротина, что привело к снижению окислительного стресса и наименьшему содержанию МДА в семенах сои. В условиях засухи в сентябре 2021 г. в семенах сои выявлено невысокое содержание МДА при высокой активности каталазы и повышенном содержании аскорбиновой кислоты.

Библиографические ссылки

1. Xavier A. Genome-Wide analysis of grain yield stability and environmental interactions in a multiparental soybean population / A. Xavier, A. D. Jarquin, R. Howard, V. Ramasubramanian [et al.] // G3: Genes Genomes Genetics. – 2018. – Vol. 8(2). – P. 519-529.
2. Guo B. Soybean genetic resources contributing to sustainable protein production / Guo B., Sun L., Jiang S. [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2022. – V. 135. – P. 4095-4121.
3. Синеговская, В. Т. Влияние обеспеченности растений минеральным питанием на содержание белка в семенах сои / В. Т. Синеговская, Е. Т. Наумченко, И. В. Ануфриева // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2020. – Т. 4. – С. 69-72.
4. Sewelam N. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road / N. Sewelam, K. Kazan, P.M. Schenk // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol. 7. – Article 187.
5. Синькевич М. С. Процессы, препятствующие повышению интенсивности перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии // М. С. Синькевич, Н. В. Нарайкина, Т. И. Трунова // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – № 6. – С. 875–882.
6. Debnath B. Acid rain deposition modulates photosynthesis, enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities in tomato / B. Debnath, M. Irshad, S. Mitra et al. // Int. J. Environ. Res. – 2018. – Vol. 12. – P. 203-214.

7. Минибаева Ф. В. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе / Ф. В. Минибаева, Л. Х. Гордон // Физиология растений. – 2023. – Т. 50, № 3 – С. 459-464.

8. Иваченко Л. Е. Методы изучения полиморфизма ферментов сои / Л. Е. Иваченко, В. А. Кашина, Е. С. Маскальцова и др. Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2008. – 142 с.

9. Ионова Е. В. Засуха и гидротермический коэффициент увлажнения как один из критериев оценки степени ее интенсивности (обзор литературы). / Е. В. Ионова, В. А. Лиховидова, И. А. Лобунская // Зерновое хозяйство России. – 2019. – № 6. – С.18-22.

10. Половникова М. Г., Воскресенская О. Л. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды // Физиология растений. 2008 Т. 55 № 5 С. 777–785.

Исследование антиоксидантной активности и потенциала экстрактов цианобактерий в отношении противоопухолевого и нейропротекторного действия

Казантаева М. А.^А, Орлова А. А.^Б, Мешалкина Д. А.^Б, Синетова М. А.^Б, Фролов А. А.^Б, Лось Д. А.^Б

^А Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

^Б Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологии, Москва, Россия.

Цианобактерии представляют собой группу автотрофных микроорганизмов, способных синтезировать широкий спектр биологически активных соединений, включая антиоксиданты. Эти соединения могут обладать выраженной биологической активностью, в том числе, противоопухолевым и нейропротекторным действием, что делает их перспективными объектами для разработки новых лекарственных средств и биологически активных добавок с доказанной эффективностью для использования в медицинской практике. Исходя из этого, задачей данного исследования являлась оценка нейропротекторных, антиоксидантных и противоопухолевых свойств метанольных экстрактов, полученных из 16 штаммов цианобактерий, которые входят в коллекцию микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН.

В исследовании использовались экстракты цианобактерий, полученные путем двукратной ультразвуковой экстракции метанолом при комнатной температуре. Антиоксидантная активность экстрактов оценивалась с помощью различных методов, таких как DPPH-метод, FRAP-метод и TEAC-метод. Соединения В-1200, В-1527, В-1600, В-1601, и В-1514 В-2022 В-1204, В-287 продемонстрировали наиболее высокую антиоксидантную активность.

Для оценки нейропротекторных свойств экстрактов исследования проводились *in vitro* на клеточных тест-системах нейронального происхождения с использованием клеточной линии нейробластомы человека SHSY5Y. Было показано, что экстракты штаммов В-1220, В-1527, В-1600, В-1601, В-1200 и В-1204 обладают нейропротекторной активностью при их нанесении в концентрации 50 мкг/мл.

В ходе эксперимента, направленного на оценку противоопухолевого воздействия экстрактов цианобактерий использовался тест оценки цитотоксичности по изменению метаболической активности клеток в присутствии тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ-тест). Об активности жизнеспособности клеток судили по данным изменения оптической плотности получившегося раствора, связанного с активностью митохондриальных дегидрогеназ. В работе были изучены влияния экстрактов в концентрации от 1 до 1000 мкг/мл на клетки HeLa. В результате проведенных исследований нами было установлено, что максимальной цитотоксической активностью по отношению к клеткам HeLa обладали экстракты В-1514 и В-1200. При концентрации экстрактов цианобактерий 45-90 мкг/мл гибель опухолевых клеток достигала 50%. Это согласуется с литературными данными, свидетельствующими о том, что цианобактерии способны продуцировать цитотоксины, которые могут являться многообещающими кандидатами на роль противоопухолевых препаратов.

Результаты исследования показали, что экстракты цианобактерий обладают высокой антиоксидантной активностью, которая может быть связана с наличием в них различных антиоксидантных соединений, таких как антоцианы и флавоноиды. Кроме того, было обнаружено, что экстракты цианобактерий способны ингибировать рост опухолевых клеток и защищать нейроны от повреждения, что указывает на их потенциальное противоопухолевое и нейропротекторное действие.

Таким образом, некоторые из изученных экстрактов цианобактерий являются перспективными источниками антиоксидантов, которые могут найти применение в медицине для профилактики и лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Однако для подтверждения этих результатов необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-30003

О вероятности антистрессового действия брассиностероидов посредством изменения состояний плазматических мембран клеток растений

Кем К. Р.^А, Ламан Н. А.^А

^А *Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, ул. Академическая 27, Беларусь. E-mail: kem-666@mail.ru*

Брассиностероиды (БС) – класс растительных стероидных гормонов, характеризующихся полигидроксированными структурами стерола со значительными показателями ростостимулирующей активности, поддерживающие функционирование иммунной системы растений, особенно, в условиях действия стрессовых факторов: при пониженных температурах, заморозках, засолении и затоплении почвы, засухе, болезнях, действии пестицидов и др. [1]. Общепринято представление, что брассиностероиды являются одним из компонентов фитогормональной системы растений. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что они вступают во взаимодействие с другими гормонами растений, увеличивают содержание абсцизовой кислоты [2], но при этом, оказывают неоднозначное воздействие на уровень ауксинов [3], гиббереллинов и цитокининов [4].

Выраженный ростостимулирующий эффект БС был выявлен с момента их открытия. В дальнейшем были проведены серии биотестов для определения их специфической биологической активности. Во всех исследованных биотестах БС были активны в чрезвычайно низких концентрациях (10^{-6} - 10^{-12} М), что отличает их от других групп фитогормонов. Однако в ряде тест-систем, применяемых при исследовании других групп фитогормонов, БС проявляли типичный эффект для того или иного гормона, в других же случаях обнаруживали противоположную направленность действия или вовсе не проявляли какого-либо эффекта. Такие противоречивые данные заставили научное сообщество обратить более пристальное внимание на механизм действия брассиностероидов и сделать предположение о возможном эпигенетическом уровне воздействия БС на физиолого-биохимические процессы клеток растений [5].

Одно из таких предположений связано с тем, что БС, как высокоокисленная форма стероидов, могут быть компонентами структуры клеточных мембран. Известно, что стеролы, глицеролипиды и сфинголипиды являются основными липидами растительных мембран. При этом стероловый состав сложен и многообразен и характеризуется обширным спектром функций в жизни растений, включающим воздействие на саму структуру мембраны и ее лабильность в стрессовых условиях. В проведенных ранее опытах по изучению мембранных стероидов живых клеток с помощью био-

физических методов было показано, что холестерин экранирует отрицательные заряды и таким образом снижает поверхностный заряд мембраны [6]. Это способствует более плотной компоновке углеводородных цепей в фазе геля, а значит, и к дополнительному повышению вязкости мембраны и снижению ее проницаемости. Важным является и то, что стерины – это химические предшественники БС. Известно, что они принимают активное участие в элонгации клеток растений и процессах морфогенеза, клеточном делении, в модуляции гормональных ответов, а также в реакции клеток на стрессовые воздействия, в том числе, при угрозе патогенных микроорганизмов [7].

Также существуют многочисленные данные о том, что brassinosterоиды изменяют активность ферментов, мембранный потенциал, активируют синтез белков и нуклеиновых кислот, изменяют состав аминокислот и жирных кислот, вызывают сдвиги в балансе других эндогенных гормонов, тем самым стимулируя удлинение и деление клеток [8]. Такие изменения на уровне целого растения выражаются в усилении роста и повышении устойчивости и продуктивности.

Другое предположение о негеномном действии brassinosterоидов связано со специализированными доменами мембран, такими как липидные рафты (плоты) и белково-гликопротеиновые комплексы. Известно, что биологические мембраны являются латерально неоднородными и включают субкомпарменты, отличающиеся по биофизическим свойствам и составу. Поэтому для унификации описания физико-химического принципа, подтверждающего латеральную мембранную гетерогенность, и была предложена гипотеза мембранных (липидных) рафтов [9].

В настоящее время понятие «мембранные рафты» определяют как динамическую наноразмерную, обогащенную стеринами и сфинголипидами, упорядоченную ассоциацию специфических белков, в которой метастабильное состояние покоя может быть активировано специфическими липид-липидными, белок-липидными и белок-белковыми взаимодействиями. В настоящее время появляется множество литературных данных, подтверждающих, что эти такие структуры придают боковое разделение мембранным белкам, способствуя пространственной организации и регулированию мембранных протеинов, влияющих на многие жизненно важные клеточные процессы. Также рафты могут взаимодействовать друг с другом, регулируя проведение сигнала снаружи внутрь клетки, вызывая при этом разнообразные ответные реакции от активации клеточного деления до апоптоза [10].

Анализ полученных нами и имеющихся в литературе экспериментальных данных позволяет высказать предположение, что brassinosterоиды, как высокоокисленная форма стерина – компонентов клеточных

мембран, определяющих их свойства, могут также осуществлять регулирование биохимических процессов несколькими путями одновременно. Такое действие может осуществляться за счет регулирования биосинтеза стерина через связывание с гипотетическим рецептором, аналогом LXR-рецептора животных [11]. В результате изменения стеринового состава мембраны повышается ее функциональная стабильность в условиях стресса. Возможно также, что брассиностероиды способны действовать на клеточные мембраны путем, не связанным с экспрессией генов, необходимых для адаптации организма, а за счет встраивания в структуру и прямого влияния на физиологическое состояние мембран, изменяя при этом их текучесть (вязкость) и проницаемость.

По итогам анализа и обобщения литературных данных, а также накопленного собственного экспериментального материала, было выдвинуто предположение, что серия экспериментов, касающихся изучения особенностей ответных реакций проростков растений на обработку экзогенными брассиностероидами на фоне стресса может дать дополнительные сведения в пользу гипотезы об их эпигенетическом действии.

Материалы и методы. Объектами исследования были семена и проростки льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Ласка, и Грант и ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Радзимич. Насыщенные спиртовые растворы брассиностероидов (10^{-5} М) были любезно предоставлены лабораторией химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси. Методом разбавления с шагом 1,25 раза был получен диапазон концентраций от 10^{-5} М до 10^{-9} М в 1%-ном водном растворе пленкообразователя Гисинар.

На основе результатов предыдущих исследований был сделан вывод о том, что концентрацией стрессоров, наиболее удобной для экспериментов является та, при которой ингибирование роста корневой системы проростков относительно оптимального контроля составляет около 40- 60% [12]. С учетом этого, концентрация N-фосфонометилглицина в опытах составляла $5,1 \cdot 10^{-4}$ М, метсульфурон-метила $6,0 \cdot 10^{-5}$ М и хлорида натрия 0,5% соответственно. Опыт включал 42 варианта в двукратной повторности, 40 вариантов БС и два контроля в четырехкратной повторности – контроль-1 (1%-ный р-р Гисинара) и контроль-2 (ингибирующая доза химического стрессора, без добавления брассиностероидов). Инкрустацию семян проводили вручную в стеклянной посуде. Расход рабочего раствора – 20 мкл/г семян. Проращивали семена в бумажных рулонах по методике проращивания плоских и мелких семян, описанной в [13]. Рулоны выдерживали 2 суток в термостате ТПС-2 при постоянной температуре 22°C, на 3-е сутки выставляли в условия искусственного освещения интенсивностью 7,5 тыс. люкс (16 ч – свет, 8 ч – темнота). Измерения длины

корня и надземной части проводили на 7 и 9-ые сутки. Для определения биометрических показателей при каждом измерении брали по 15 проростков из каждого варианта и по 30 проростков из контролей. Статистическая обработка проводилась с помощью стандартного пакета Excel.

Согласно полученным нами данным, во всех сериях экспериментов обнаруживается однотипность ростовых реакций на стрессоры различных химических групп, а также относительно низкие предельные значения превышения над контролем в вариантах, где различные по химической структуре БС используются на фоне стрессового фактора. Так, в каждом конкретном случае обнаруживалось, что протекторное действие БС было на уровне не более 25% (по сравнению с контролем без БС), что может свидетельствовать о лимитированной возможности для реализации адаптогенного потенциала (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность действия брассиностероидов внутри диапазонов «активных концентраций» на фоне химического стресса

№ п.п.	Брассиностероид	Показатели максимального усиления (+) или ослабления (-) ингибирующего эффекта N-фосфонометилглицина брассиностероидами в сравнении с контролем (без БС) внутри диапазона «активных концентраций», %	
		Яровой ячмень (сорт Радзимич)	Лен-долгунец (сорта Ласка и Грант)
1	Брассинолид	-17,8	+13,8
2	Гомобрассинолид	-20,0	+16,8
3	Эпибрассинолид	-12,1	+20,9
4	Кастастерон	-16,7	+24,3
5	Гомокастастерон	-24,7	+19,2
6	Эпикастастерон	-18,1	+18,3

Этот факт согласуется с предположением о том, что протекторное действие БС осуществляется посредством эпигенетического изменения свойств и/или биохимического состава клеточных мембран, так как именно в этом случае антистрессовое действие БС будет ограничено пределами, в которых «от» и «до» может проявляться лабильность физиологического состояния мембран.

О негеномном действии брассиностероидов может свидетельствовать также факт, что протекторная активность данных соединений на фоне химического стресса проявляется в узком диапазоне концентраций. Так, при изучении действия БС (в данном случае ЭБЛ) на рост проростков льна-долгунца на фоне стресса, вызванного N-фосфонометилглицином, метсульфурон-метилом и солью NaCl, в каждом из экспериментов был обнаружен диапазон концентраций БС, где присутствовал выраженный ан-

тистрессовый эффект. Отмечено, что наиболее чувствительными к действию стрессора и брассиностероидного компонента оказались ростовые процессы корневой системы. Соответственно, были построены кривые зависимости доза-эффект в действии БС на линейный рост корней проростков на фоне каждого стрессора, используемого в эксперименте (рис. 1).

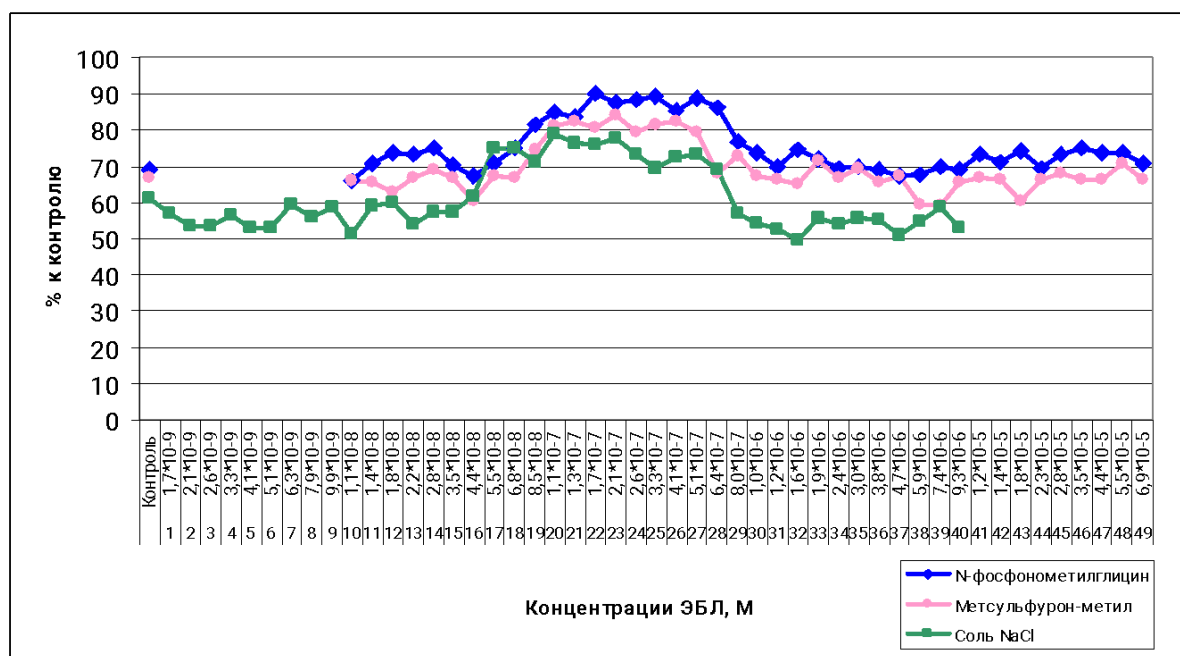


Рис. 1. Зависимость длины корня от концентрации ЭБЛ у проростков льна-долгунца сорта Грант на фоне химического стресса

На графике отчетливо видны диапазоны концентраций эпибрассинолида, в которых он ослабляет ингибирующее действие стрессоров на рост корневой системы проростков. Данные диапазоны практически совпадают – активность БС проявляется в дозе 10^{-8} – 10^{-7} М, а изменение концентраций внутри диапазонов составляет от 6 до 11,7 раза. Предположительно, это обусловлено действием брассиностероидов на клеточную мембрану – либо непосредственно на ее структурные компоненты, либо через функциональную регуляцию ионных каналов. В таком случае, к примеру, может повышаться вязкость цитоплазмы клеток, что способствует лучшей адаптации к неблагоприятным факторам или усиливаться аккумуляция сахаров внутри клетки, что также положительно влияет на толерантность растения к стрессу.

Стоит отметить, что объекты исследования генетически разнородны и, соответственно, имеют различные защитные механизмы, направленные на противостояние неблагоприятным факторам. Однако в наших исследованиях выявлена идентичная реакция растений на стрессоры химической

природы в присутствии brassinosterоидов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в данном случае генетические различия не имеют значения, а действие БС осуществляется на эпигенетическом уровне – посредством изменения свойств и состояний клеточных мембран. Такие изменения всегда имеют определенные пределы, обусловленные физиологическими возможностями растительной клетки. Поэтому негеномное действие БС в таких случаях будет строго детерминировано, что и подтверждается результатами проведенных экспериментов.

Библиографические ссылки

1. Khripach, V. A. Brassinosteroids – A New Class of Plant Hormones / V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, Ae. De Groot. – Academic Press, 1999. – 456 p.
2. Divi, U.K. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis show interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathway / U. K. Divi, T. Rahman., P. Krishna // BNC Plant Biology. – 2010. – Vol. 10. – P. 151.
3. Манжелесова, Н. Е. Фитогормоны и фенольные соединения в борьбе с болезнями растений / Н. Е. Манжелесова, А. П. Волюнец // Наука и инновации. – 2015. – № 3 (145). – С. 62-65.
4. Гималов, Ф. Р. Участие brassinosterоидов в механизмах повышения устойчивости растений к низким температурам / Ф. Р. Гималов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2020. – № 3. – С. 34-40.
5. Стрельцова, Д. Е. Негеномные эффекты стероидных гормонов: роль ионных каналов / Д. Е. Стрельцова, М. А. Черныш, П. В. Гриусевич, В. В. Демидчик // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2019. – № 3. – С. 3-12.
6. Антонов, В.Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран / В. Ф. Антонов // Москва : Наука, 1982. – с.150.
7. Nakashita, H. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice / H. Nakashita [et al.] // Plant Journal. – 2003. – № 33. – P. 887-889.
8. Fridman, Y. Brassinosteroids in growth control: How, when and where / Y. Fridman [et al.] // Plant Science. – 2013. – № 209. – P. 24-31.
9. Жуков, А. В. О качественном составе липидов мембран растительных клеток / А. В. Жуков // Физиология растений. – 2021. – №2. – С. 206-224.
10. Веснина, Л. Э. Липидные рафты: роль в регуляции функционального состояния клеточных мембран / Л. Э. Веснина // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2013. – Т. 13, № 2 (42). – С. 5-10.
11. Giguere, V. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function / V. Giguere // Endocrine Reviews. – 1999. – V.20, №5. – P. 689-725.
12. Ламан, Н. А. Ростовые реакции проростков отдельных видов и сортов сельскохозяйственных растений на обработку семян глифосатом (N-фосфонометилглицином) / Н. А. Ламан, К.Р. Кем, А.Ф. Судник // Вес. Нац. акад. навук Беларусі Сер. біял. навук. – 2016. - № 4. – С. 7-13.
13. Ламан, Н. А. Проращивание мелких, плоских и долго прорастающих семян рулонным методом с использованием синтетической вентиляционной сетки / Н. А. Ламан, С. И. Будай, О. Э. Барнатович // Известия Акад. аграр. наук Респ. Беларусь. – 2000. – № 4. – С. 57-61.

Hairy CRISPR: изучение функциональных особенностей корневых систем растений с помощью метода геномного редактирования CRISPR/Cas

Кириушкин А. С.^{A*}, Ильина Е. Л.^A, Демченко К. Н.^A

^A Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия.

*E-mail: akiryushkin@binran.ru

Метод геномного редактирования CRISPR/Cas становится многообещающим инструментом функциональной геномики растений. *Rhizobium rhizogenes*-опосредованная трансформация – быстрый и удобный подход для получения трансгенных корней. В сочетании эти методы представляют собой быстрое и эффективное средство для изучения функций различных генов в процессах развития корневых систем [Gogolev et al., 2021. Plants. 10: 1423; Kiryushkin et al., 2022. Plants. 11: 51]. Активные формы кислорода (АФК) являются важными сигнальными молекулами, регулирующими различные физиологические ответы корневых систем на динамично меняющиеся условия окружающей среды [Huang et al., 2019. J. Exp. Bot. 70: 5879-5893]. CRISPR/Cas-опосредованная генетическая модификация гомеостаза АФК является одним из основных подходов для исследования сигнального каскада с участием этих молекул [Xu et al., 2022. Reactive Oxygen Species in Plants: Methods and Protocols: 25-41].

Основными компонентами векторной конструкции для редактирования генома являются: кассета, несущая ген, кодирующий нуклеазу Cas; кассета, экспрессирующая направляющую РНК (нРНК) и кассета, кодирующая селективный или скрининговый маркер трансгенности [Kiryushkin et al., 2022. Plants. 11: 51]. После сборки полученный вектор используется для трансформации растений с помощью соответствующего штамма *R. rhizogenes*.

На сегодняшний день в экспериментах, сочетающих *R. rhizogenes*-опосредованное получение трансгенных корней и редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas, использовано более 26 видов растений [Kiryushkin et al., 2022. Plants. 11: 51]. Применение геномного редактирования CRISPR/Cas совместно с использованием *R. rhizogenes*-опосредованной трансформации охватывает различные направления, такие как проверка эффективности редактирования геномов; получение CRISPR/Cas-редактированных растений, регенерированных из отдельных отредактированных бородатых корней; изучение развития или функции корневых систем, симбиоза с почвенными микроорганизмами, устойчивости к биотическим или абиотическим факторам среды или метаболической инженерии [Kiryushkin et al., 2022. Plants. 11: 51].

В представленном докладе будут рассмотрены основные принципы редактирования генома растений с помощью системы CRISPR/Cas, такие как различные компоненты CRISPR/Cas векторов, типы Cas нуклеаз, принципы дизайна нРНК, а также возможные области применения редактирования генома бородатых корней, включая генетическую модификацию гомеостаза АФК.

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания «Структурно-функциональные и молекулярно-генетические основы развития и адаптации высших растений» (№ 1021071912890-3-1.6.11).

Влияние водного дефицита на содержание дегидринов в клетках каллусной культуры сосны обыкновенной

**Коротаева Н. Е.^{A,*} Шмаков В. Н.^A, Пятрикас Д. В.^A,
Молдавская С. Э.^A**

^A Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия,
*E-mail: knev73@yandex.ru

Последствия водного дефицита (ВД) приносят вред растениям как в естественных условиях природной среды, так и в процессе хозяйственной деятельности человека, поэтому представляются актуальными исследования защитных механизмов, позволяющих растениям противостоять этому стрессору. В условиях ВД защитные белки дегидрины (ДГ) действуют на клеточном уровне и проявляют свойства “молекулярного щита”, который предотвращает неспецифические взаимодействия у других белков и мембранных структур и их повреждения [Atkinson et al., 2016]. ДГ также способны связывать АФК и снижать их токсическое влияние в период действия ВД [Wang et al., 2024]. По сравнению с ДГ других видов голосеменных связь ДГ с засухоустойчивостью мало изучена у широко распространенного хвойного вида - сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). В данном исследовании, по нашим сведениям, впервые ДГ сосны обыкновенной были изучены на клеточном уровне в период действия ВД с использованием каллусной культуры *in vitro* в связи с антиоксидантной активностью клеток. Каллусные культуры были получены на эксплантах почек и побегов пяти опытных деревьев сосны обыкновенной (д1-д5). Культуры существенно отличались по своим ростовым характеристикам, проявлениям окислительного стресса и антиоксидантной активности клеток в контрольных условиях. Культуры побегов и почек д2 росли медленнее других, отличались более ранней некротизацией, их клетки накапливали большое количество АФК, имели повышенную активность ПОЛ и пониженную жизнеспособность клеток и активность каталазы

(КАТ) и пероксидазы (ПО). Судя по перечисленным признакам, клетки культуры д2 уже в контрольных условиях испытывали состояние окислительного стресса. Культуры д3 и д4 имели противоположные ростовые и физиологические характеристики, по сравнению с таковыми у клеточной культуры д2. У остальных культур значения изученных физиологических параметров сильно варьировали. В контрольных условиях в каллусах были обнаружены ДГ Mr 72, 54, 47, 43, 38, 34, 29 и 27 кД. Из них ДГ Mr 72, 38 и 27 кД были обнаружены у всех изученных каллусных культур. ДГ 34 кД оказался специфичным только для культур – производных побегов и почек д3. Добавление в среду культивирования 5 или 8% ПЭГ на 10 сут вызвало небольшое снижение содержания общей воды в клетках каллусных культур, которое не превышало 7%, и сокращение прироста культур. В условиях ВД в клетках культур почек происходил рост содержания пероксида водорода и активности ПОЛ. У всех культур отмечался рост активности КАТ и ПО. У каллусов, полученных от разных деревьев, различия в этих параметрах превышали те различия, которые произошли после добавления ПЭГ, что указывает на существенное влияние на ростовые и биохимические свойства клеток генотипических межиндивидуальных различий между опытными деревьями. У культур – производных побегов и почек д2 после воздействия ВД значения жизнеспособности клеток и активности КАТ и ПО были самыми низкими, а содержание пероксида водорода, напротив, повышенным по сравнению с остальными культурами. У культур д3 и д4 в условиях ВД параметры активности ферментов и содержания пероксида водорода имели противоположные значения, что указывает на повышенную способность клеток этих культур противостоять ВД по сравнению с д2. Такое предположение соответствует литературным данным [Sen 2012]. Под действием ВД в клетках каллусов, полученных из тканей почек, увеличилось содержание ДГ: Mr 72, 38 и 27 кД у культуры д1; ДГ 38 и 27 кД у культур д2 и д3; ДГ 27 кД у культур д2, д3 и д4, при этом накопление всех перечисленных белков оказалось наименьшим в культуре д2. Таким образом, в нашем исследовании ВД повлиял на скорость роста, развитие окислительного стресса, активность антиоксидантных ферментов и накопление ДГ в клетках каллусных культур побегов и почек, которые отличались по уровню жизнеспособности. При этом рост содержания ДГ Mr 72, 38 и 27 кД происходил у культур, которые различались по происхождению, биохимическим параметрам и активности антистрессового ответа, что указывает на универсальность такой реакции. Пониженное накопление ДГ в клетках культуры д2, в клетках которой проявления окислительного стресса были особенно сильно выражены, говорят в пользу значения ДГ для преодоления внутриклеточного окисления, вызванного ВД. Дальнейшее исследование этих белков может быть

направлено на выяснение их роли при действии ВД. В наших экспериментах окислительные процессы активизировались в клетках каллусов наряду с небольшим снижением содержания общей воды в ответ на ВД. Назначением ДГ, которые накапливались в ответ на ВД, может быть не только роль “молекулярного щита”, который снижает вероятность неспецифических взаимодействий и повреждений мембран и белков, но и роль связывания АФК и снижения таким образом интенсивности окислительных процессов, сопутствующих развитию ВД. Раскрытие роли данных ДГ сосны обыкновенной в формировании устойчивости к окислительному стрессу, который сопровождает ВД, и выявление механизма их действия требуют дальнейших исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-10035, <https://rscf.ru/project/23-24-10035>.

Библиографические ссылки

1. Atkinson, J.; Clarke, M.W.; Warnica, J.M.; Boddington, K.F.; Graether, S.P. Structure of an Intrinsically Disordered Stress Protein Alone and Bound to a Membrane Surface. *Biophys J.* 2016, 111, 480-491. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.07.001>.
2. Sen, A. Oxidative stress studies in plant tissue culture. In *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology “Antioxidant Enzyme”*; ElMissiry, M.A., Ed.; World’s largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher (INTECH): London, UK, 2012; pp. 59–88.
3. Wang, X.; Liu, H.; Li, Y.; Zhang, L.; Wang, B. Heterologous overexpression of Tawzy1-2 gene encoding an SK3 dehydrin enhances multiple abiotic stress tolerance in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. *Planta*. **2024**, 259, 39. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04328-4>.

Модификация ионных токов через плазматическую мембрану клеток корня *Arabidopsis thaliana* L. при воздействии Ni²⁺

Кошель С. А.^А, Гриусевич П. В.^А, Мацкевич В. С.^А, Демидчик В. В.^{А*}

^А *Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: dzemidchik@bsu.by*

Никель – тяжелый металл, токсичный для растительных и животных организмов. Его содержание в среде постоянно увеличивается в связи с развитием промышленности и поступлением из природных источников [1]. На сегодняшний день отказ от использования никелевых сплавов для снижения его выброса в среду невозможен. Так, никель является обязательным компонентом нержавеющей стали и других изделий, используемых в быту. У большинства видов растений никель вызывает задержку роста и развития, хлороз и некроз листьев. Одним из ранних симптомов

токсичности Ni^{2+} является замедление удлинения клеток корня и побурение корневой системы. [2]. Первичной мишенью воздействия никеля на высшие растения является плазматическая мембрана клеток корня. Ряд исследований указывают на то, что Ni^{2+} могут блокировать катионные каналы и транспортеры в плазматической мембране, приводя к нарушению транспортных свойств мембраны и вызывая дефицит микроэлементов у растений [3]. Особый интерес представляет воздействие никеля на калиевую проводимость плазматической мембраны высших растений в связи с высокой значимостью данного элемента в регуляции большинства физиологических процессов в растительной клетке. Показано, что при воздействии стрессовых факторов одной из первичных реакций является отток калия из клеток корня [4]. Потенциально данную реакцию могут опосредовать K^+ -селективные и ряд неселективных катионных каналов [5]. Токсичность избытка Ni^{2+} для растений обусловлена его высокоспецифичным связыванием с некоторыми группами лигандов в белках и полисахаридах, а также индукцией окислительного стресса вследствие гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) [6]. В присутствии высоких уровней Ni^{2+} в клетках растений обнаруживаются многочисленные окислительные повреждения, однако механизмы редокс-зависимых токсических эффектов Ni^{2+} остаются неясными, так как, по имеющимся данным, в биологических условиях ионы Ni^{2+} не проявляют редокс-активности и, следовательно, не могут напрямую катализировать реакции Хабера-Вейса для образования гидроксильных радикалов. АФК-генерирующую способность Ni^{2+} связывают с тем, что катализатором синтеза АФК могут выступать редокс-активные комплексы Ni –Гис и Ni –Гис₂, способные к переносу электронов на молекулу H_2O_2 и генерации гидроксильных радикалов, а не сами Ni^{2+} . Такие комплексы образуются только с L-гистидином, который синтезируется в растениях в ответ на никелевый стресс, и должны способствовать снижению токсического эффекта от Ni^{2+} . Однако, в соответствии с рядом исследований, никель-гистидиновые комплексы могут обладать большей токсичностью в связи с высокой способностью катализировать генерацию АФК. Следовательно, важной задачей при исследовании воздействия никелевого стресса, является анализ воздействия комплексов никеля с гистидином на проводимость плазматической мембраны клеток корня высших растений [7].

В работе использовались 7-12-дневные проростки *A. thaliana* природного экотипа WS-0, культивируемые в одинаковых стерильных условиях на гелевой среде, содержащей 100% солей по стандартной прописи Мурашиге и Скуга с витаминами, 0,25% фитогеля, 1% сахарозы, pH 6,0. Протопласты выделялись согласно ранее разработанным протоколам с использованием ферментативных смесей, содержащих целлюлазу Onozuka RS

(Yakult Honsha, Япония), целлюлизин (CalBiochem, Великобритания), пектолиазу Y-23 (Yakult Honsha, Япония) [8]. Для создания гигаомной изоляции между стеклянным микроэлектродом и плазматической мембраной протопласта, использовался наружный раствор следующего состава: 20 mM CaCl_2 , 0,1 mM KCl , 2 mM Мес, 1 mM Трис, pH 6,0. Состав пипеточного раствора: 40 mM глюконата калия, 10 mM KCl , 100 нМ Ca^{2+} (0,85 mM CaCl_2 , 2 mM ЭГТА), pH 7,2. Электрофизиологические измерения производились при помощи пэтч-кламп усилителя Dagan Cornevores Series (Dagan Corporation, Япония) и аналого-цифрового преобразователя на базе Axon Instruments (Molecular Devices, США). Использовались стандартные пэтч-кламп протоколы, ранее развитые в наших лабораториях [8]. Подавались прямоугольные импульсы напряжения от -180 мВ до $+45$ мВ в деполяризующем направлении. Токи регистрировались на максимуме активации, на их основе строились и анализировались стационарные вольт-амперные кривые.

В контрольных условиях были зарегистрированы классические наружу- и внутрь направленные проводимости плазматической мембраны клеток корня *A. thaliana*. При гиперполяризации мембраны (потенциал фиксации = -180 мВ) была зарегистрирована внутрь-направленная Ca^{2+} -проводимость. При деполяризации ($+45$ мВ) – наблюдался время-зависимый наружу-направленный K^+ -ток. При добавлении в наружный раствор 1 mM Ni^{2+} было зарегистрировано ингибирование выходящего K^+ -тока $\sim$ в 1,8 раза, изменений в Ca^{2+} -проводимости зарегистрировано не было. Согласно литературным данным, совместное введение Ni^{2+} и гистидина способствует снижению токсического эффекта от данных ионов [7]. В этой связи было протестировано изменение проводимости плазматической мембраны клеток корня *A. thaliana* при введении в наружный раствор 1 mM Ni^{2+} и 2 mM гистидина. Было зарегистрировано «лавинообразное» повышение выхода K^+ $\sim$ в 2 раза по сравнению с контролем, при этом активации Ca^{2+} -проницаемых каналов не наблюдалась. Снижение выхода K^+ из клеток корня, вероятно, указывает на блокирование наружу-выпрямляющих K^+ -каналов GORK, доминирующих в плазматической мембране клеток корня высших растений. Последующее восстановление и увеличение выходящего K^+ -тока может быть связано с хелатированием ионов никеля и последующей активацией наружу-выпрямляющих K^+ -каналов ввиду редокс-активности данных комплексов.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б24-060) и ГПНИ (№ ГР 20241163).

Библиографические ссылки

1. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment / B. Shahzad [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2018. – Vol. 132. – P. 641–651.
2. Мацкевич, В. С. Механизм трансмембранного и дальнего транспорта никеля в высших растениях / В. С. Мацкевич, В. В. Демидчик // Экспериментальная биология и биотехнология. – 2023. – №. 2. – С. 4–29.
3. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution / H. Rahman [et al.] // Journal of Plant Nutrition. – 2005. – Vol. 28. – P. 393–404.
4. Demidchik, V. Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells / V. Demidchik // J. Plant Physiol. – 2014. – Vol. 171. – P. 696–707.
5. Demidchik, V. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signaling and development / V. Demidchik, F. Maathuis // Tansley Review. New Phytol. – 2007. – Vol. 175. – P. 387–405.
6. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation / M.A. Hossain [et al.] // J. Bot. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–37.
7. Ингибирование ростовых процессов и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля и никель-гистидиновых комплексов / В. С. Мацкевич [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2020. – №. 1. – С. 11–19.
8. Demidchik, V. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots / V. Demidchik, M. Tester // Plant Physiology. – 2002. – Vol. 128, № 2. – P. 379–387.

Анализ морфологических симптомов поражения декоративных растений фитопатогенами с использованием подходов цифрового фенотипирования

**Кошиц Т. О.^{А*}, Прохорчик П. О.^А, Бондаренко В. Ю.^А,
Демидчик В. В.^А**

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: tanya.koschits@icloud.com

Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в процессе поражения растений фитопатогенами. АФК могут оказывать как защитное действие, способствуя гибели патогенов, так и повреждать растительные ткани, усиливая симптомы поражений [1, 2]. Визуальная диагностика позволяет фиксировать проявления этих процессов на уровне тканей и органов растений. Наличие некрозов, хлорозов, пятен и деформаций листьев часто связано с локальными вспышками продукции АФК в ответ на патогенное воздействие. Аннотация и анализ изображений помогают выявлять

и классифицировать эти симптомы, что может быть полезным для понимания механизмов окислительного стресса и разработки стратегий защиты растений от фитопатогенов.

Целью исследования являлось установление особенностей поражений листьев декоративных растений патогенными организмами с использованием технологии машинного обучения и цифрового фенотипирования.

Сбор данных осуществлялся путем самостоятельной съемки с помощью цифровых зеркальных фотоаппаратов (Canon EOS 600D; Nikon D3400) на территории Учебно-опытного республиканского унитарного предприятия «Щемяслица» Белорусского государственного университета и Памятника природы республиканского значения «Дубрава», а также путем извлечения изображений из внешних баз данных. Изображения классифицировались по типам поражений и снабжались метками, соответствующими 11 классам поражений: ожоги, мучнистая роса, хлорозы, пятнистости, черная гниль, ложная мучнистая роса, вирус мозаики, ржавчина, парша, трипсы и белокрылки. Для классификации типов поражения декоративных растений фитопатогенами в данной работе использовалось семейство нейронных сетей EfficientNets, архитектура которых основана на принципе композитного масштабирования, что позволяет одновременно увеличивать глубину, ширину и разрешение сети для достижения оптимального баланса между точностью и вычислительными затратами. Выбор наиболее подходящей архитектуры и подбор гиперпараметров проводился с использованием набора данных, содержащего по 300-400 изображений четырех классов поражений. Основное обучение моделей проводилось на большем наборе данных, включающих собственные изображения и изображения из баз данных. Получены результаты с высокой точностью классификации различных типов для большинства классов, что подтверждается метриками. Наиболее высокую точность и F1-меру продемонстрировали модели для определения симптомов черной гнили (F1-Score 0.80), ложной мучнистой росы (F1-Score 0.83) и мучнистой росы (F1-Score 0.82). Полученные результаты демонстрируют возможность применения цифрового фенотипирования для диагностики заболеваний декоративных растений.

Библиографические ссылки

1. Sharma, P. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions // *Journal of Botany*. – 2012. – № 1. – P. 217-231.
2. Simko, I. Phenomic Approaches and Tools for Phytopathologists / Simko I., Jimenez-Berni J. A., Sirault X. R. R. // *Phytopathology®*. – 2017. – № 1 (107). – P. 6-17.

Ответ антиоксидантной системы растений на обработку растений эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* при их росте в условиях абиотического стресса

Кузнецова М. В.^А, Фархутдинов Р. Г.^Б

^А ООО «Научно-внедренческое предприятие «БашИнком», Уфа, Россия,

*E-mail: feomela_lina@mail.ru

^Б Уфимский университет науки и технологий, кафедра биохимии и биотехнологии, Уфа, Россия

Наиболее часто при изучении устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды учитывается активность антиоксидантных ферментов – пероксидазы и каталазы, которые непосредственно обезвреживают активные формы кислорода (АФК) и обеспечивают комплексную защиту растения. Механизм положительного влияния штаммов *Bacillus subtilis* при воздействии различных стрессовых факторов на растения остается в центре внимания специалистов, изучающих растительно-микробные ассоциации. Известно, что положительное действие бактерий рода *Bacillus* на растительные организмы основано на выделении биологически активных веществ – стимуляторов роста [Феоктистова и др., 2016; Маркина, Курамшина, 2016]. Антистрессовый эффект *B. subtilis* установлен при воздействии на растения абиотических факторов, но мало сведений о влиянии обработок биопрепаратами на устойчивость растений к действию недостатка воды в почве [Курамшина, 2017]. Целью настоящей работы явилось изучение влияния штаммов *Bacillus subtilis* (биопрепарат «Фитоспорин М», производитель ООО «НВП БашИнком») на рост и активность антиоксидантных ферментов в условиях засухи.

С целью проверки предположения, что обработка растений *B. subtilis* может повысить с.-х. культур к засухе, мы провели оценку показателей антиоксидантной системы у разных видов растений, обработанных биопрепаратом в условиях искусственной засухи. Засуху создавали путем уменьшения полива почвы (25% от ППВ).

Известно, что засуха приводит к накоплению АФК, образующихся, в основном, в хлоропластах, и в митохондриях, что формирует окислительный стресс, связанный с воздействием на молекулярные и клеточные структуры супероксид-анион радикала, гидроксильного радикала, синглетного кислорода, перекиси водорода и других соединений. Снижение токсического эффекта окислительного стресса растения проводят с помощью различных групп антиоксидантов, которые уменьшают степень окислительного повреждения и повышают устойчивость растения к неблагоприятным факторам (засухе, засолению, действие тяжелых металлов). Де-

токсикация АФК происходит благодаря действию антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, пероксидаза и каталаза). Кроме того, что при незначительной степени засухи активность антиоксидантных систем повышается, однако при дальнейшем росте обезвоживания растения наблюдается уменьшение активности защитных ферментов (Ebrahimi et al., 2016).

Активность каталазы в побегах контрольных необработанных проростков пшеницы достоверно не различалась от показателей необработанных растений, выросших при оптимальном увлажнении. Обработка семян пшеницы биопрепаратом приводила к повышению активности каталазы при оптимальном увлажнении (70% влажности), а в условиях засухи у растений, обработанных биопрепаратом, активность каталазы увеличивалась и была больше необработанных растений, выросших при тех же условиях у пшеницы. Активность пероксидазы в условиях засухи увеличивалась у необработанных растений пшеницы (на 16,2%). У обработанных *B. subtilis* растений пшеницы при действии засухи достоверных отличий в активности фермента не установлено.

Известно, что при засухе происходит накопление свободных радикалов, которые индуцируют перекисное окисления липидов мембран, что приводит к их повреждению. МДА является конечным продуктом перекисного окисления липидов клеточных мембран и одним из признаков их повреждения. Нами было установлено, что уровень МДА в побегах необработанных бактериями растений пшеницы в условиях засухи повышался на почти 60% по сравнению с растениями, выросшими при оптимальном увлажнении. Обработка растений препаратом, содержащим бактерии *B. subtilis*, приводила к увеличению содержания МДА в побегах при засухе, но его содержание было меньше, чем у необработанных бактериями растений.

В условиях засухи важную роль в качестве осмопротектора играет пролин. Накопление пролина позволяет растениям противостоять засухе в связи с участием пролина в стабилизации белков, мембран и субклеточных структур и приводит к уменьшению уровня АФК. Следовательно, содержание пролина является хорошим показателем для определения устойчивости растений к действию засухи, особенно, когда происходит снижение активности защитных ферментов и уменьшаются у растения механизмы, позволяющие уменьшать вредоносное действие, наносимое засухой. Содержание пролина в побегах необработанных биопрепаратом растений в условиях с моделированной засухи было больше, чем у растений пшеницы, выросших при оптимальном увлажнении – на 28%. Обработка растений пшеницы повышала уровень пролина в условиях оптимального увлажнения почвы на 30%. В условиях засухи обработка семян *B. subtilis*

способствовала повышению уровня пролина по сравнению с необработанными на 44,7%.

Таким образом, нами было установлено, что в условиях моделирования почвенной засухи растения, инокулированные клетками бактерий *B. subtilis*, росли лучше необработанных растений. При моделировании жесткой и достаточно длительной засухи (30 дней) бактерии биопрепарата не оказывали заметного влияния на активность каталазы и пероксидазы, но значительно повышали уровень пролина в побегах растений. Обработанные бактериями биопрепарата растения содержали МДА в меньшем количестве, чем необработанные, что свидетельствует о снижении уровня развития окислительного стресса у обработанных растений и повышении их засухоустойчивости.

Библиографические ссылки

1. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р. Ризосферные бактерии / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева, М.Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – № 2. – С. 207–224.
2. Курамшина З.М. Повышение толерантности *Triticum aestivum* к кадмий-стрессу с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* / З.М.Курамшина, Ю.В. Смирнова, Р.М. Хайруллин // Физиология растений. –2016. – Т. 63. □ № 5. – С. 1-9.
3. Маркина В.О., Курамшина З.М. // Современные проблемы науки и образования. 2016. No 6 <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25759> (дата обращения: 22.06.2024).
4. Ласточкина О.В., Пусенкова Л.И., Юлдашев Р.А., Ильясова Е.Ю., Aliniaei-fard S. // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, С. 958-96
5. Ebrahimi, M. Antioxidant activity: a strategy for alleviating the effects of drought on *Calendula officinalis* L. / M. Ebrahimi, G. R. Zamani, Z. Alizadeh // European Journal of Medicinal Plants – 2016. – Vol. 15(4). – P.1-14.
6. Ласточкина О.В. (2021). Адаптация и устойчивость растений пшеницы к засухе, опосредованная природными регуляторами роста *Bacillus* spp.: механизмы реализации и практическая значимость (обзор). Сельскохозяйственная биология, 56 (5), 843-867.
7. Lastochkina O., Baymiev A., Shayahmetova A., Garshina D., Koryakov I., Shpirnaya I., Pusenkova L., Mardanshin I., Kasnak C., Palamutoglu R. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. Plants, 2020, 9: 76 (doi: 10.3390/plants9010076).

Влияние наночастиц селена и селенита натрия на активность глутатионпероксидазы в проростках редиса

Курнушко А. С.^{А*}, Азизбекян С. Г.^Б, Молчан О. В.^А

^А Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф.Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь. *E-mail: annkurnushko@mail.ru

^Б Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

В последнее время наночастицы (NP_S) все чаще используются для реализации эффективных стратегий улучшения роста растений, поскольку они обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными материалами. Особый интерес представляют NP_S, содержащие селен (Se) [1-3]. Se имеет один из самых узких диапазонов между дефицитом и токсичностью. В небольших количествах Se действует на растения как антиоксидант, снижая накопление активных форм кислорода (АФК), стимулирует развитие, повышая устойчивость к окислительному стрессу, качество и урожайность. Глутатионпероксидаза (GPX, EC 1.11.1.9), один из ключевых элементов антиоксидантной системы, играет важную роль в снижении уровня АФК во многих организмах. Растительные GPXs - мономерные белки, которые связаны с путями детоксикации тиоредоксина (Trx) и глутатиона (GSH). Есть предположение, что они более эффективно используют Trx, чем GSH, для снижения уровня H₂O₂ и органических пероксидов [4]. Анализ субклеточной локализации у различных видов растений показал, присутствие GPXs в хлоропластах, митохондриях, цитоплазматической, ядерной и внеклеточной областях [5]. Растительные GPXs в системе антиоксидантной защиты поддерживают гомеостаз H₂O₂ и нормализуют реакцию растений на абиотический стресс [6, 7]. Появилось несколько работ, в которых было показано, что применение Se NP_S повышает активность GPXs у различных растений [8, 9]. Однако эффекты зависели от режима обработки, характеристик NP_S и вида растения. Следует также отметить, что во многих живых организмах охарактеризованы Se-зависимые GPXs. Однако их функционирование в клетках растений остается дискуссионным вопросом. Также мало изучено влияние Se в наноформе на активность GPXs. Целью данной работы была сравнительная оценка влияния NP_S Se и селенита натрия при внекорневой обработке на активность GPX в проростках редиса.

Объектом исследования были проростки редиса (*Raphanus sativus* L.) сорта Дайкон. Растения выращивали 7 сут на гидропонной установке. На 5 и 6 сут проростки обрабатывали (внекорневая обработка) суспензией наночастиц селена или раствором селенита натрия в концентрации от 1 до 1000 мг/л. Для определения активности GPX растительную ткань гомогенизировали в Tris-HCl буфере (pH 7.5) при 4°C и центрифугировали при

10000g. Активность измеряли согласно [10] с небольшими изменениями. Для ферментативной реакции смешивали 400 мкл 0,1 мМ GSH, 200 мкл 1,3 мМ H_2O_2 , 200 мкл натриевого буфера (0.067М, pH 7.5) и 200 мкл супернатанта. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при 25°C. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1% ТХУ и центрифугировали при 3100 g в течение 10 мин при 4°C. Для оценки активности неферментативного превращения GSH ТХУ добавляли до супернатанта. Далее смешивали 480 мкл полученного супернатанта (после ферментативной и неферментативной реакции), 2,2 мл 0,32 М Na_2HPO_4 и 320 мкл 1мМ 5,5-дитио-бис-2-нитробензойной кислоты, инкубировали в течение 5 мин и измеряли оптическую плотность поглощения при 412 нм с помощью спектрофотометра (СФ-2000, Россия). Содержание белка определяли методом Брэдфорда с использованием БСА в качестве стандарта [11]. Размеры наночастиц (гидродинамические радиусы) определяли с помощью метода динамического рассеяния света на лазерном анализаторе Zetasizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания) при разбавлении растворов деионизованной водой в различных соотношениях – от 1 : 10 до 1 : 1000. Массовые доли селена в растворах исследуемых образцов определяли на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой VISTA PRO (Varian, США). Статистическую обработку данных выполняли с использованием табличного процессора MS Excel. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для оценки достоверности различий между экспериментальными вариантами применяли однофакторный дисперсионный анализ. Различия показателей считали достоверными при $P < 0,05$ [12Error: Reference source not found].

В исследованиях использован наноматериал, синтезированный в виде коллоида на основе нерастворимых наночастиц аморфного Se^0 в виде нанокompозита с биогенным полимером поливинилпирролидон, что обеспечивает безопасность применения (IV класс, вещества малоопасные) в сравнении с высокотоксичным селенитом натрия [13,14].

На рисунке 1 представлены гистограммы распределения размеров частиц Se. Видно, что тестируемый образец характеризуется достаточно высокой полидисперсностью (15 -70 нм). Средний размер NP_s - около 38 нм.

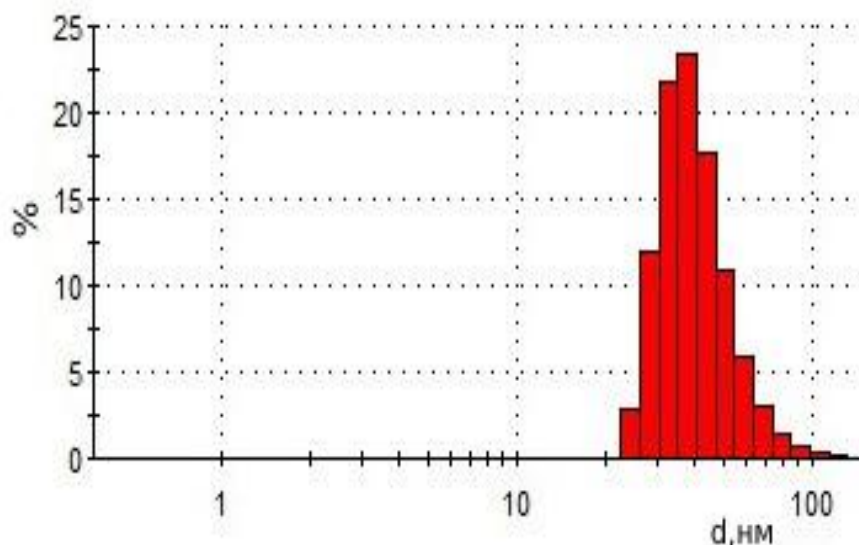
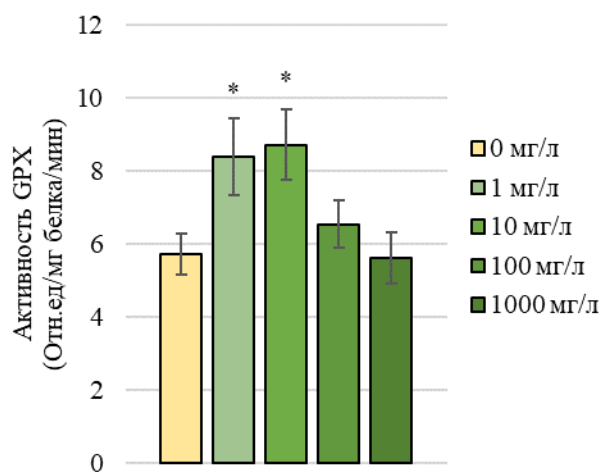


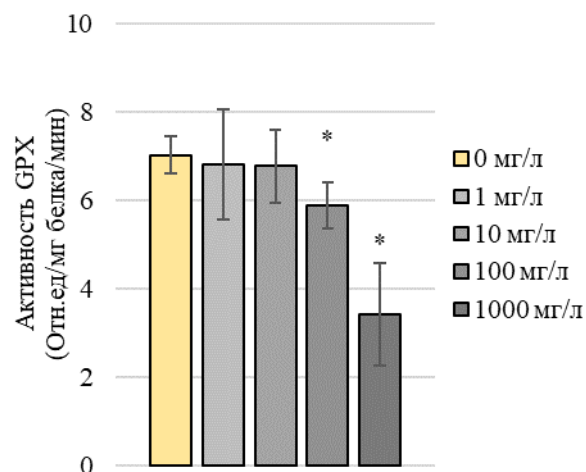
Рис. 1. Размеры Se NPs

Определена активность GPX в разных частях 7-дневных проростков редиса (семядольных листьях, стеблях и корнях) после внекорневой обработки Se NPs и селенитом натрия в широком диапазоне концентраций (рис. 2). Достоверного эффекта препаратов Se на активность фермента в корнях растений обнаружено не было. При этом, в семядольных листьях и стеблях активность GPX повышалась на 25-35% в результате применения Se NPs в концентрациях 1 и 10 мг/л (листья), и 10, 100 и 1000 мг/л (стебли). Обработка раствором селенита натрия не приводила к активации фермента в листьях, а, напротив, вызывала выраженное снижение активности при 100 и 1000 мг/л. В то же время, GPX в стебле стимулировалась при всех используемых концентрациях селенита натрия. Кроме того, активность GPX в стеблях вообще была значительно выше. Это может быть связано с активным клеточным делением и высоким содержанием АФК. Известно, что глутатион регулирует процессы деления, дифференцировки клеток и переход от фазы G_1 к S фазе клеточного цикла [15]. Таким образом, мы можем предположить активную роль селено-зависимой GPX в этих процессах в проростках редиса и стимулирующее действие Se NPs на ее активность.

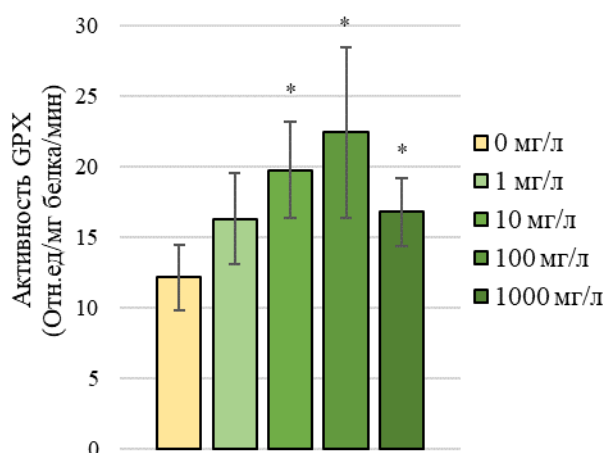
А



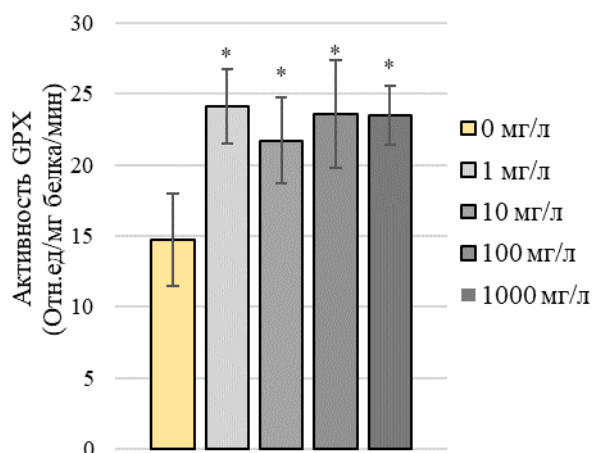
Б



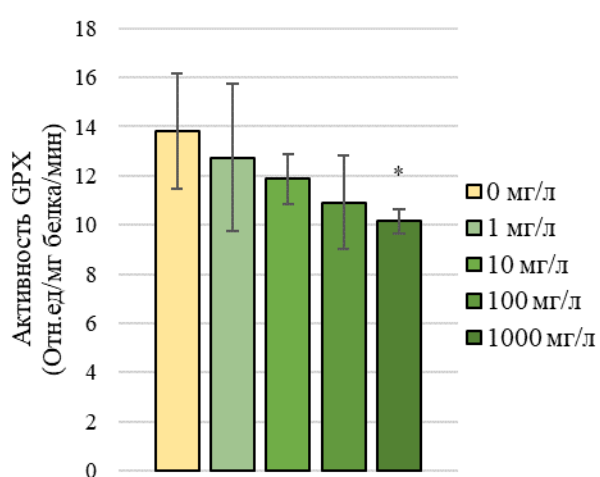
В



Г



Д



Е

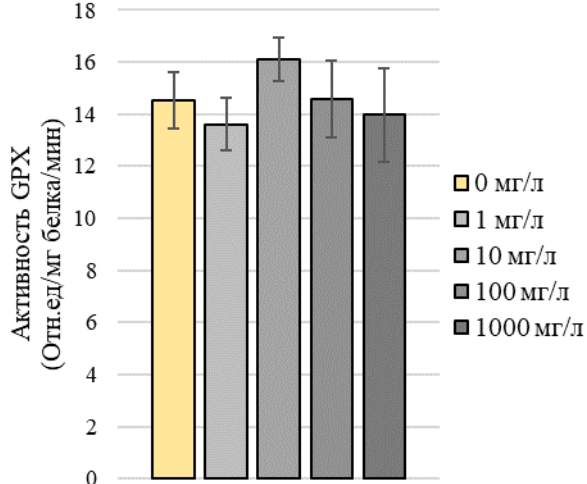


Рис. 2. Влияние наночастиц Se NPs (а,в,д) и селенита натрия (б,г,е) на активность GPX в семядольных листьях (а,б), стеблях (в,г) и корнях (д,е) 7-дневных проростков редиса. Данные представлены в виде средних значений со стандартным отклонением, * – достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Полученные результаты согласуются с данными других авторов, показавших, что обработка семян редиса нанокompозитами Se на основе арабиногалактана, крахмала и каррагинана способствовала достоверному росту активности GPX в побеге и корне 5-дневных проростков [8]. Внесение Se NPs в субстрат вызывало стимуляцию фермента в листьях томата [8]. В то же время применение Se NPs не приводило к повышению GPX активности в плодах перца *Capsicum annuum* L. Напротив, активность снижалась по сравнению с контролем при использовании частиц в концентрациях от 1 до 45 мг/л [16]. Различия в действии Se NPs на активность GPX, скорее всего, объясняются особенностями характеристик наноматериалов, режимов обработки, видов и физиологического состояния растений.

Таким образом, было показано, что после внекорневой обработки проростков редиса наночастицами селена повышается активность GPX в семядольных листьях и стеблях. Селенит натрия оказывал стимулирующее действие на GPX только в стебле, при этом высокие концентрации снижали активность фермента в листьях.

Библиографические ссылки

1. Selenium nanoparticles induce growth and physiological tolerance of wastewater-stressed carrot plants / A. I. El-Batal [et al.] // *Biologia*. – 2023. – Vol. 78, N 9. – P. 2339–2355.
2. Green synthesis of Se nanoparticles and its effect on salt tolerance of barley plants / G. Habibi, Y. Aleyasin // *Int. J. Nano Dimens.* – 2020. – Vol. 11, N 2. – P. 145–157.
3. Seed priming with the selenium nanoparticles maintains the redox status in the water stressed tomato plants by modulating the antioxidant defense enzymes / M. Ishtiaq [et al.] // *Plants*. – 2023. – Vol 12, N 7. – P. 1556.
4. Glutathione peroxidases in plants: innumerable role in abiotic stress tolerance and plant development / Madhu [et al.] // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2023. – Vol. 42, N 2. – P. 598–613.
5. Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses / K. Bela [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 176. – P. 192–201.
6. Genomewide characterization of glutathione peroxidase (GPX) gene family in rape-seed (*Brassica napus* L.) revealed their role in multiple abiotic stress response and hormone signaling / W. Li [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – V. 10, N 9. – P. 1481.
7. Comprehensive identification of glutathione peroxidase (GPX) gene family in response to abiotic stress in pepper (*Capsicum annuum* L.) / W. Wang [et al.] // *Gene*. – 2023. – Vol. 881. – P. 147625.
8. Нурминский В. Н. [и др.] Ростостимулирующая активность нанокompозитов селена в природных полимерных матрицах при прорастании семян культурных растений // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 495. – №. 1. – С. 607–611.
9. Impact of selenium and copper nanoparticles on yield, antioxidant system, and fruit quality of tomato plants / H. Hernandez-Hernandez [et al.] // *Plants*. – 2019. – Vol. 8, N 10. – P. 355.

10. The application of selenium and copper nanoparticles modifies the biochemical responses of tomato plants under stress by *Alternaria solani* / T. Quiterio-Gutierrez [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20, N 8. – P. 1950.
11. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical biochemistry. – 1976. – Vol. 72, N 1-2. – P. 248–254.
12. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск: Выш. шк., 1973. – 320 с.
13. Влияние солей и наночастиц селена и кремния на рост мицелия *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. и *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. и прорастание семян злаковых культур / А. С. Курнушко [др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 4. – С. 332–344.
14. Межгосударственный стандарт. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М.: Стандартинформ, 2007. – 7 с.
15. Cell division and turgor-driven stem elongation in juvenile plants: a synthesis / U. Kutschera, K. J. Niklas // Plant Science. – 2013. – Vol. 207. – P. 45–56.
16. Selenium nanoparticles improve quality, bioactive compounds and enzymatic activity in jalapeno pepper fruits / M. A. Sarinana-Navarrete [et al.] // Agronomy. – 2023. – Vol. 13, N 3. – P. 652.

Анализ участия пероксида водорода в системном изменении содержания фитогормонов при распространении переменного потенциала

**Ладейнова М. М.^{А*}, Кузнецова Д. В.^А, Мудрилов М. А.^А,
Печёрина А. А.^А, Воденеев В. А.^А**

^А Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Институт биологии и биомедицины, кафедра биофизики, Нижний Новгород, Россия.

*E-mail: ladeynova.m@yandex.ru

В ответ на действие неблагоприятных факторов окружающей среды в растениях происходит генерация и передача стрессовых сигналов, которые обеспечивают скоординированные изменения физиологических процессов. Локальные стимулы вызывают распространение дистанционных сигналов и системные изменения содержания фитогормонов. Актуальным вопросом являются механизмы индукции системных изменений содержания фитогормонов. Предполагается участие активных форм кислорода (АФК) и электрических сигналов, в частности переменного потенциала (ВП), в индукции биосинтеза гормонов в нераздражённых частях растения при локальной стимуляции. Электрические и АФК-сигналы, вероятно, связаны между собой, и их взаимодействие лежит в основе специфичных механизмов инициации системного биосинтеза фитогормонов. Таким образом, целью данной работы является анализ участия пероксида водорода

(H₂O₂) в качестве АФК-сигнала в системном изменении содержания фитогормонов при распространении переменного потенциала.

Исследования выполнялись на растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) дикого типа (WT) и мутантной линии *rbohD* с нокаутом НАДФН-оксидазы RBOHD. ВП индуцировали локальным нагревом кончика листа. Регистрацию ВП проводили с помощью многоканальной макроэлектродной установки. Одновременно с регистрацией ВП выполняли исследование динамики концентрации H₂O₂ с помощью флуоресцентного зонда Ampliflu Red. Анализ содержания фитогормонов – жасмонатов (12-оксо-фитодиеновая кислота (ОФДК), жасмоновой кислоты (ЖК) и жасмонил-изолейцин (ЖК-иле), абсцизовой кислоты (АБК) и салициловой кислоты (СК) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии. Для ингибиторного анализа листья пшеницы подвергали вакуумной инфильтрации растворами N,N'-диметилтиомочевина (DMTU, скавенджера H₂O₂) и дифенилениодония хлорида (DPI, ингибитора НАДФН-оксидазы). Искусственную индукцию гормональных сдвигов с помощью H₂O₂ также проводили методом вакуумной инфильтрации раствора H₂O₂.

Локальный нагрев вызывает распространение ВП и системное увеличение содержания жасмонатов, АБК и СК. В пшенице концентрации ЖК и ЖК-иле достигают максимума через 10 – 20 мин после раздражения, СК – через 40 мин, АБК – через 60 мин. Содержание ОФДК возрастает через 5 – 10 мин, а через 20 мин значительно снижается. Генерация ВП сопровождается временным увеличением концентрации H₂O₂. DMTU вызывал подавление распространения ВП, что указывает на роль H₂O₂ в качестве индуктора ВП. Действие DPI также приводило к уменьшению амплитуды ВП, причём больший эффект он оказывал с увеличением расстояния от места стимуляции, что свидетельствует о вкладе НАДФН-оксидаз в поддержание распространения ВП за счёт активной продукции АФК. Результаты также подтверждаются данными по подавлению ВП в растениях арабидопсиса мутантной линии *rbohD*. Повышение концентрации H₂O₂, которое имеет место при распространении ВП, может принимать участие в стимул-индуцированном изменении содержания гормонов. Для анализа участия H₂O₂ в качестве индуктора биосинтеза гормонов проводили исследование влияния искусственного повышения его концентрации на содержание гормонов. Показано сходство динамики содержания гормонов при искусственной индукции H₂O₂ и при локальной стимуляции: концентрации АБК и СК возрастают через 45 мин после добавления H₂O₂, ЖК и ЖК-иле – через 15 мин, концентрация ОФДК через 15 мин снижается. Таким образом, взаимодействие электрических и АФК-сигналов является

одним из потенциальных механизмов индукции системного биосинтеза стрессовых фитогормонов при действии локальных стимулов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00388).

Анализ профилей экспрессии генов микобионта и фотобионта лишайника *Lobaria pulmonaria* в ответ на УФ-индуцированную меланизацию

Лексин И. Ю.^{А*}, Шелякин М. А.^Б, Минибаева Ф. В.^А

^А Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия;

^Б Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

*E-mail: lecsinilya@mail.ru

Лишайники являются сложными симбиотическими системами, состоящими из грибного компонента – микобионта и водорослевого – фотобионта (одного или нескольких). Одним из видов стресса, с которым сталкиваются лишайники, является УФ-индуцированный стресс. Ультрафиолетовое излучение является одним из абиотических факторов, способных вызывать серьёзные негативные последствия у живых организмов: окислительный стресс, фотоповреждение биомолекул, а также подавление роста и развития. Механизмы стрессовой устойчивости, позволяющие противостоять воздействию УФ-облучения, включают как биосинтез фотозащитных пигментов, так и устранение отрицательных эффектов, вызванных УФ. Основной причиной токсичности УФ-излучения является образование активных форм кислорода (АФК), которые повреждают белки, липиды, углеводы и ДНК (Gill and Tuteja, 2010). Ввиду этого, воздействие УФ-В может привести к регуляции множества генов, участвующих в утилизации АФК (Sharma *et al.*, 2012; Robson *et al.*, 2019). В настоящее время влияние УФ-излучения на экспрессию генов в высших растениях детально изучено, однако в лишайниках влияние УФ-В излучения на профили экспрессии генов неизвестно. В связи этим, нами было проведено исследование УФ-В индуцированных изменений экспрессии генов на примере лишайника *Lobaria pulmonaria* для микобионта и эукариотического фотобионта – *Symbiochloris reticulata*.

Влияние абиотического стресса на транскриптомы лишайников изучено относительно мало, хотя есть несколько сообщений о влиянии температурного стресса и обезвоживания на экспрессию генов (Junttila *et al.*, 2013; Candotto *et al.*, 2016; Chavarria-Pizarro *et al.*, 2022; Almer *et al.*, 2023). В настоящей работе мы показываем, что воздействие УФ-В на лишайник

L. pulmonaria изменяет экспрессию генов как у микобионта, так и фотобионта. Стоит отметить, что количество УФ-индуцированных дифференциально экспрессированных генов (ДЭГов) микобионта (1670) превосходило число ДЭГов хлоробионта (344) к 11-ому дню УФ-облучения. Причина наблюдаемых различий заключается в экранировании УФ-излучения верхним корковым слоем таллома (кортексом) лишайника, что обеспечивает защиту хлоробионта. Оценка параметра *browning reflectance index* (BRI) позволила нам количественно оценить УФ-индуцированное потемнение талломов относительно контроля, которое усиливалось с увеличением длительности воздействия УФ-В. Результаты световой микроскопии позволили детально визуализировать пигментацию верхнего кортекса и подтвердить накопление фотопротекторных метаболитов.

Из данных литературы известно, что УФ-В индуцирует биосинтез меланина в *L. pulmonaria* (Gauslaa and Solhaug, 2001), хотя точный тип синтезируемого меланина оставался неясным. В одном из предыдущих сообщений предполагалось, что содержание азота в меланинах *L. pulmonaria* несколько меньше, чем в типичных эумеланинах, но больше, чем в алломеланинах (Mafole *et al.*, 2019). Теоретически это может указывать на то, что меланин в *L. pulmonaria* синтезируется из более чем одного типа мономеров. Наблюдаемое соотношение C:N в выделенных меланинах и данные анализа экспрессии генов позволяют предположить, что большая часть меланина, синтезируемого *L. pulmonaria*, скорее всего, представляет собой эумеланин. У грибов биосинтез эумеланина требует активности фенолоксидаз, таких как тирозиназы и лакказы (относятся к мультимедным оксидазам) (Matee *et al.*, 2016), а УФ-В облучение *L. pulmonaria* приводит к повышению активности генов, кодирующих тирозиназу (*Tyr6*) и мультимедную оксидазу (*MCO1*) (рис. 1).

Тем не менее, мы предполагаем, что биосинтез алломеланина, получаемого из соединений, относящихся к пульвинонам, и производных нафталена, также может иметь место. У *Aspergillus terreus* биосинтез Asp-меланина, мономером которого является пульвинон, требует экспрессии генов, кодирующих как NRPS-подобный фермент, так и тирозиназу (Belozerskaya *et al.*, 2017). У *A. terreus* аспулвинон E может полимеризоваться тирозиназой, что приводит к образованию Asp-меланина (Geib *et al.*, 2019). У *L. pulmonaria* обработка ультрафиолетовыми лучами повышает активность генов *NRPS1* и *NRPS2*, кодирующих NRPS-подобные ферменты, а также генов *Tyr6*, что указывает на возможность синтеза Asp-меланина (рис. 1). Помимо эумеланина и Asp-меланинов, у *L. pulmonaria* также есть гены, гомологичные тем, которые участвуют в биосинтезе DHN-меланина. Так, УФ-В увеличивает экспрессию биосинтетического генного кластера (БГК), который участвует в биосинтезе производного

нафталена. В литературе описан гомолог поликетидсинтазы (PKS) из данного кластера для *A. parvulus*, и показана роль гомологичной PKS в синтезе 2-ацетил-1,3,6,8-тетрагидрокси нафталена (Mosunova *et al.*, 2023). Данное соединение после ряда химических преобразований может служить мономером DHN-подобных меланинов или выступать в качестве самостоятельного фотопротекторного соединения.

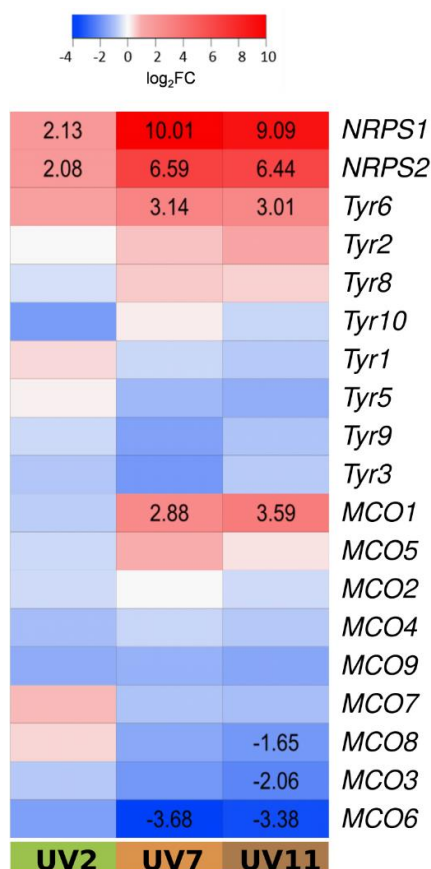


Рис 1. Тепловая карта на основе значений $\log_2FC$ для предполагаемых генов биосинтеза эумеланина (Tyr и MCO) и Asp-меланина (NRPS и Tyr). Наличие значения $\log_2FC$ ($\log_2$ -трансформированные изменения экспрессии относительно контроля) в ячейках тепловой карты указывает на статистически значимые изменения для гена ($p\text{-value} < 0,05$). Tyr – тирозиназа, MCO – мультимедная оксидаза, NRPS – NRPS-подобный фермент, UV2 – 2-ой день УФ-облучения, UV7 – 7-ой день УФ-облучения, UV11 – 11-ый день УФ-облучения

Помимо генов и БГК биосинтеза потенциальных мономеров меланинов, мы также выявили БГК, участвующие в синтезе антрахинонов и ксантонов. Известно, что эти соединения относятся к фотопротекторным соединениям (Nguyen *et al.*, 2013; Goga *et al.*, 2020), а также обладают антиоксидантной активностью (Wu *et al.*, 2018) и могут снижать общий окислительный стресс, вызванный УФ-В.

В настоящем исследовании мы обнаружили ДЭГи, кодирующие белки, связанные с глутатионом, в обоих симбионтах *L. pulmonaria* и белки, связанные с тиоредоксином, в микобионте. Регуляция генов, кодирующих классические ферменты, нейтрализующие АФК, например каталазы, также происходит в ответ на УФ-облучение в микобионте *L. pulmonaria*, что согласуется с увеличением активности каталазы в лишай-

нике *P. aphthosa* после УФ-облучения (Shelyakin *et al.*, 2021). В митохондриях и хлоропластах существует несколько альтернативных путей транспорта электронов, которые предотвращают образование АФК. Интересно, что УФ-индуцированное повышение активности SHAM-чувствительного альтернативного дыхательного пути у *L. pulmonaria* коррелирует с повышением уровня генов АОХ у обоих мико- и фотобионта. Таким образом, УФ-В повышает уровень генов, участвующих в предотвращении образования АФК и детоксикации АФК в обоих симбионтах *L. pulmonaria*.

В микобионте ДЭГи включали целый ряд генов, классически связанных со стрессовой устойчивостью, в том числе гены, участвующие в окислительно-восстановительном метаболизме, сворачивании белков, протеолизе и убиквитинировании. Двадцать ДЭГов, кодирующих шапероны, были стимулированы как при раннем (2-ой день УФ-облучения), так и при позднем (11-ый день УФ-облучения) УФ-стрессе. Наибольшие изменения среди ДЭГов, кодирующих шапероны, были обнаружены для гена BCS1, который кодирует митохондриальный шаперон. Этот ген входит в топ-20 существенно повышенных ДЭГов как при раннем, так и при позднем УФ-стрессе. Экспрессия генов, связанных с окислительно-восстановительными процессами, кодирующие глутатион-зависимые белки, такие как Mss4-подобный белок, глутаредоксин, глутатион S-трансфераза и глутатион-редуктаза, а также две каталазы, была повышена только во время позднего УФ-стресса. Экспрессия генов, кодирующих белки митохондриальной электронно-транспортной цепи (ЭТЦ), такие как АОХ, альтернативная NADH-дегидрогеназа, и гены, кодирующие шаперон биогенеза железо-серных кластеров из семейства белков теплового шока 70 (HSP70), также была повышена.

У фотобионта *S. reticulata* ДЭГи, связанные со стрессом, включали HSP, в частности HSP20, HSP70 и ClpB1, антиоксидантные ферменты, например, аскорбатпероксидазу и глутатион-зависимые белки, такие как глутатион-S-трансфераза и Mss4-подобный белок. Повышение экспрессии этих генов наблюдалось во 2-ой день УФ-облучения и продолжалось до 11-ого дня, что указывает на их участие как в ранних, так и поздних стрессовых реакциях. Среди генов, связанных с окислительно-восстановительными процессами, гены, кодирующие АОХ, демонстрировали наибольшее увеличение экспрессии в фотобионте. Кроме того, гены, связанные с фотозащитными или фоточувствительными функциями, такие как пирин, криптохром и один ген, связанный с биосинтезом каротиноидов, были повышены в 7-ой и 11-ый дни УФ-облучения.

В данном исследовании впервые проанализировано влияние УФ-В на экспрессию генов в лишайниках. Морфологические изменения, вызван-

ные УФ-В, включают в себя пигментацию верхнего кортекса, и на основании транскриптомного анализа мы предполагаем, что это является следствием синтеза различных типов меланинов, таких как эумеланин и алломеланин. Наряду с этим, происходит регуляция генов, отвечающих за биосинтез некоторых других вторичных метаболитов, таких как нафталены, антрахиноны и ксантоны. Кроме того, УФ-В вызывает значительные изменения в транскрипции генов, участвующих в других защитных механизмах, таких как обезвреживание АФК, синтез и защита белков. В целом, наши данные свидетельствуют о том, что реакция *L. pulmonaria* на УФ-излучение регулируется сложным взаимодействием активности генов как грибного, так и водорослевого симбионтов.

Работа проводилась в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН и поддержана грантом РФФИ № 23-14-00327.

Библиографические ссылки

1. Almer, J. Symbiont-specific responses to environmental cues in a threesome lichen symbiosis [Text] / J. Almer, P. Resl, H. Gudmundsson, D. Warshan, Ó.S. Andr sson, S. Werth // Molecular Ecology. – 2023. – V. 32. – P. 1045-1061.
2. Belozerskaya, T. A. Melanin pigments of fungi [Text] / T. A. Belozerskaya, N. N. Gessler, A. A. Aver'yanov // Fungal Metabolites. – 2017. – V.2017. – P. 263-291.
3. Carniel, F.C. New features of desiccation tolerance in the lichen photobiont *Trebouxia gelatinosa* are revealed by a transcriptomic approach [Text] / F.C. Carniel, M. Gerdol, A. Montagner, E. Banchi, G. De Moro, C. Manfrin, L. Muggia, A. Pallavicini, M. Tretiach // Plant Molecular Biology. – 2016. – V. 91. – P. 319-339.
4. Chavarria-Pizarro, T. Gene expression responses to thermal shifts in the endangered lichen *Lobaria pulmonaria* [Text] / T. Chavarria-Pizarro, P. Resl, A. Janjic, S. Werth // Molecular Ecology. – 2021. – V.31. – P. 839-858.
5. Gauslaa, Y. Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria* [Text] / Y. Gauslaa, K. A. Solhaug // Oecologia. – 2001. – V.126. – P. 462-471.
6. Geib, E. Cross-chemistry leads to product diversity from atromentin synthetases in *Aspergilli* from section *Nigri* [Text] / E. Geib, F. Baldeweg, M. Doerfer, M. Nett, M. Brock // Cell Chemical Biology. – 2019. – V.26. – P. 223-234.
7. Gill, S.S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [Text] / S.S. Gill, N. Tuteja // Plant Physiology and Biochemistry. – 2010. – V. 48. – P. 909-930.
8. Goga, M. Lichen metabolites: an overview of some secondary metabolites and their biological potential [Text] / M. Goga, J. Ele ko, M. Marcin inov , D. Ru ov , M. Ba kov , M. Ba kor // Co-evolution of Secondary Metabolites. – 2020. – P. 175-209.
9. Junttila, S. Whole transcriptome characterization of the effects of dehydration and rehydration on *Cladonia rangiferina*, the grey reindeer lichen [Text] / S. Junttila, A. Laiho, A. Gyenesi, S. Rudd // BMC genomics. – 2013. – V.14. – P. 1-14.
10. Mafole, T. C. Occurrence and possible roles of melanic pigments in lichenized ascomycetes [Text] / T. C. Mafole, K. A. Solhaug, F. V. Minibayeva, R. P. Beckett // Fungal Biology Reviews. – 2019. – V.33. – №. 3-4. – P. 159-165.

11. Matee, L.P. et al. Characterization and role of tyrosinases in the lichen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. [Text] / L.P. Matee, R.P. Beckett, K.A. Solhaug, F.V. Minibayeva // The Lichenologist. – 2016. – V. 48. – P. 311-322.
12. Mosunova, O.V. Evolution-informed discovery of the naphthalenone biosynthetic pathway in fungi [Text] / O.V. Mosunova, J.C. Navarro-Muñoz, D. Haksar, J. van Neer, J. Hoeksma, J. den Hertog, J. Collemare // mBio. – 2022. – P. e00223-22.
13. Nguyen, K. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners [Text] / K. Nguyen, M. Chollet-Krugler, N. Gouault, S. Tomasi // Natural Product Reports. – 2013. – V.30. – P. 1490-1508.
14. Robson, M.T. A perspective on ecologically relevant plant-UV research and its practical application [Text] / T. Matthew Robson, P.J. Aphalo, A.K. Banaś, P.W. Barnes, C.C. Brelsford, G.I. Jenkins, T.K. Kotilainen, J. Łabuz, J. Martínez-Abaigar, L.O. Morales, S. Neugart, M. Pieristè, N. Rai, F. Vandenbussche, M.A.K. Jansen // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2019. – V. 18. – P. 970-988.
15. Sharma, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions [Text] / P. Sharma, A.B. Jha, R.S. Dubey, M. Pessarakli // Journal of Botany. – 2012. – V. 2012. – P. 1-26.
16. Shelyakin, M.A. The effect of UV-B radiation on the antioxidant system in the *Peltigera aphthosa* and *Peltigera rufescens* lichens [Text] / M.A. Shelyakin, E.V. Silina, T.K. Golovko // Journal of Siberian Federal University. – Biology. – 2021. – V. 14. – P. 328-338.
17. Wu, Z.H. Antioxidant xanthenes and anthraquinones isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. [Text] / Z.H., Wu, D., Liu, Y., Xu, J.L., Chen, W.H., Lin // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2018. – V.16. – P. 219-224.

Влияние внесения источника селена в состав питательной среды на антиоксидатные свойства каллусной культуры и культуры микрополюсов розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis* L.)

Логвина А. О.^{A*}, Мухина А. А.^A

^A Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: lohvina@bsu.by

Метод культуры клеток и тканей растений находит широкое применение в современной биологии, играя значительную роль как в повышении эффективности классических путей селекции при создании новых сортов, получении свободных от вирусов популяций и сохранении редких видов растений, так и в современных способах получения ценных биологически активных веществ. Незаменим данный подход при генетическом улучшении и изучении процесса морфогенеза растений *in vitro* на всех уровнях организации. Культуры клеток и тканей активно используются в микроклональном размножении – одном из способов вегетативного размножения, результатом которого является получение растений, идентичных материнскому. Каллус представляет собой недифференцированную массу клеток, начинающую свой рост из культивируемой ткани. Данный

тип культур *in vitro* является основой многих методик и всесторонне изучается. Культура микропобегов – объект растительной биотехнологии, основа для разработки подходов к микрклональному размножению. Она также является источником ценных биологически активных веществ, благодаря генетической стабильности, и способом длительного поддержания каллусных культур. Практический интерес для биотехнологии растений представляют пряно-ароматические растения, среди которых одним из самых известных является розмарин лекарственный (*Rosmarinus officinalis* L.). Эфирное масло розмарина и лекарственные препараты на его основе проявляют явные противовоспалительные, антибактериальные, противогрибковые, цитостатические и антиоксидантные свойства. Для стимуляции повышения уровня целевых метаболитов и биомассы питательные среды могут дополнять новыми компонентами, в частности минеральными элементами, не входящими в основной состав минеральной основы питательных сред элементами. Одним из таких элементов является селен.

Целью данной работы было изучить влияние селенита натрия на антиоксидантную активность ретрактов каллуса и культуры микропобегов розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis* L.).

Объектами изучения служила каллусная культура и культура микропобегов розмарина лекарственного, полученные нами в 2022 г. В работе была использована питательная среда Мурасиге и Скуга (МС). Каллусную культуру поддерживали на среде при добавлении 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д) и 6-бензиламинопурина (6-БАП) в концентрациях 0,3 мг/л. Культуру микропобегов выращивали на половинной среде МС в присутствии 5,0 мг/л 6-БАП. Источником углерода и энергии служила сахароза в концентрации 30,0 г/л. В качестве уплотняющего агента во всех экспериментах применяли агар-агар в концентрации 8,0 г/л.

В питательную среду для установления влияния на физиологические показатели вводили источник неорганического селена в одной из основных, эффективно поглощаемых и метаболизируемых растительными клетками форме, – в виде селенита натрия (Na_2SeO_3), в концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М. Контролем служила питательная среда без добавления данного вещества. Каллусная культура поддерживалась в условиях микробиологического термостата при температуре 25°C в темноте, культура микропобегов поддерживалась при температуре 25°C в условиях фитостата (14 ч света/10 ч темнота).

Для установления влияния селенита натрия на антиоксидантный потенциал объектов *in vitro* розмарина лекарственного определяли общее содержание фенольных соединений, антирадикальную, хелатирующую и восстановительную активности экстрактов. Общее содержание феноль-

ных соединений выражали в эквиваленте галовой кислоты (ЭГК), а показатели антиоксидантного потенциала – в эквиваленте аскорбиновой кислоты (ЭАК). Пробоподготовку проводили следующим образом: материал сушили в течение 3-х суток при 60°C, измельчали до порошкообразного состояния, паковали и хранили в сухом и темном месте. Экстракцию осуществляли 70 %-м этанолом при соотношении сырья и экстрагента 1:100, путем настаивания смеси в течение 24 ч при непрерывном помешивании при комнатной температуре с последующим нагреванием на водяной бане в течение 1 ч при 70°C. После остывания экстракты фильтровали через бумажный фильтр и центрифугировали в течение 15 мин при 3500 об/мин.

На первом этапе исследования определяли изменение суммарного содержания фенольных соединений под воздействием селенита натрия. Фенольные соединения, являясь низкомолекулярными антиоксидантами, зачастую определяют антиоксидантный потенциал растительных вытяжек.

Анализ результатов позволяет заключить, что содержание фенольных соединений либо в целом сопоставимо с контрольным уровнем, либо значительно его превышает. Для каллусной культуры минимальное содержание фенольных соединений отмечено в контрольном варианте и на среде, включающей 10^{-7} М селенита натрия (9,4 мг/г сух. м.), а максимальное – на среде с внесением 10^{-6} М соединения селена (18,1 мг/г сух. м.) и 10^{-5} М (16,5 мг/г сух. м.).

В случае культуры микрополюсов минимальное содержание фенольных соединений было характерно для среды с содержанием селенита натрия 10^{-3} М (14,9 мг/г сух. м.), а максимальное содержание данных веществ определялось в объекте, выращиваемом в присутствии селенита в концентрациях 10^{-6} М (27,1 мг ЭГК/г сух. м.) и 10^{-4} М (25,5 мг ЭГК/г сух. м.). Нужно отметить, что селенит натрия в концентрации 10^{-6} М стимулировал и рост каллуса несмотря на то, что в литературе для различных объектов часто описывается обратная зависимость между данными показателями, так как фенольные соединения часто выполняют роль ингибиторов роста, чтобы повысить устойчивость для перенесения стрессовых условий.

С повышением концентрации селенита в среде хелатирующая активность экстрактов каллуса уменьшалась. Она была практически равна контрольному значению при концентрации 10^{-7} М (13,6 мг ЭАК/г сух. м.) и постепенно снижалась в ряду 10^{-7} – 10^{-3} М (6,5 мг ЭАК/г сух. м.). Для микрополюсов наблюдалась схожая закономерность, однако на среде с 10^{-6} М селенита хелатирующая активность была достоверно выше по сравнению с контролем – 10,6 и 9,2 мг ЭАК/г сух. м. соответственно. Селенит натрия практически не оказывал положительного влияния на антирадикальную

активность исследуемых объектов. Слабый стимулирующий эффект в отношении данного показателя был отмечен как для каллуса, выращиваемого на среде с 10^{-3} М селенита (4,6 мг ЭАК/г сух. м.) по сравнению с контролем (4,1 мг ЭАК/г сух. м.), так и для культуры микропобегов (0,98 мг ЭАК/г сух. м. на среде с 10^{-3} М селенита и 0,90 мг ЭАК/г сух. м. в контроле). Восстановительная активность в исследуемых объектах достоверно не увеличилась под воздействием селенита относительно контроля. Показано, что культура микропобегов и каллус розмарина демонстрируют однотипную реакцию на внесение селенита натрия в среду, несмотря на наличие морфологических и физиологических различий данных биотехнологических объектов.

Таким образом, на данный момент установлено, что селенит натрия оказывает положительный эффект на некоторые показатели антиоксидантного потенциала культур *in vitro* розмарина лекарственного в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-5} М. Это можно объяснить тем, что селен повышает устойчивость растительных культур к действию неблагоприятных факторов среды за счет активизации работы ферментативной антиоксидантной системы, что связано с замедлением процессов их старения, удлинением стационарной фазы роста. А элиситорные свойства селена стимулируют повышение уровня вторичных метаболитов и биомассы. В дальнейшем планируется изучение влияния сочетанного действия соединений селена и органических компонентов питательных сред.

Библиографические ссылки

1. Slinkard, K. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods / K. Slinkard, V. L. Singleton // American journal of enology and viticulture. – 1977. – Vol. 28. – P. 49–55.
2. *In vitro* studies of polyphenol compounds, total antioxidant capacity and other dietary indices in a mixture of plants (Prolipid) / Z. Jastrzebski [et al.] // International Journal of Food Sciences and Nutrition. – 2007. – Vol. 58, Iss. 7. – P. 531–541.
3. Huang, S. Concentrations and antioxidant activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain / S. Huang, J.C. Kuo // Proc. Natl. Sci.Counc. ROC. – 2000. – Vol. 24, No 4. – P. 193–201.
4. Prieto, P. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E / P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar // Anal. Biochem. – 1999. – Vol. 269. – P. 337–341.

Использование bottom-up протеомного подхода в изучении гликированных белков хлоропластов

**Лукашева Е. М.^{А*}, Соловьева М. А.^А, Горбач Д. П.^Б, Соболева А. В.^Б,
Фролов А. А.^Б**

^А Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербург, Россия. *E-mail: elena_lukasheva@mail.ru

^Б Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологии, Москва, Россия

Гликирование белков это совокупность реакций взаимодействия amino и гуанидиновых групп белков с восстанавливающими сахарами или карбонильными продуктами их деградации. Этот процесс протекает с образованием как ранних (обратимо формирующихся), так и менее химически лабильных конечных продуктов глубокого гликирования (КПГГ). Как нами было показано ранее, гликирование широкого спектра белков по специфическим сайтам, так называемым «горячим точкам», сопровождает ответ растения на действие стрессора. В этом контексте, процесс фотосинтеза является важным контрибьютером гликирования растительных белков. Действительно, с одной стороны он является поставщиком активных форм кислорода радикальной природы, с другой - высокореактивных производных сахаров. В присутствии свободных радикалов и следовых количеств переходных металлов происходит аутоокисление сахаров и их лабильных производных сахаров, приводящее к образованию высокореактивных α -дикарбонильных соединений. Взаимодействие этих соединений с боковыми радикалами остатков лизина и аргинина приводит к образованию широкого спектра КПГГ. В этом отношении наибольший интерес представляют так называемые амидные КПГГ, которые, по результатам наших исследований *in vitro*, являются продуктами таких интермедиатов цикла Кальвина, как рибулозо-1,5 дифосфат и триозофосфаты. В настоящее время в литературе имеется информация о гликированном протеоме как целых растений, так и отдельных органов, однако данных о протеоме таких органелл, как пластиды, в том числе постратрансляционных модификаций белков хлоропластов под действием стресса недостаточно. Поэтому целью данной работы стало охарактеризовать паттерны гликирования протеома хлоропластов в норме и при стрессе.

Для ответа на этот вопрос была выделены изолированные хлоропласты листьев 45-дневных растений *Nicotiana benthamiana*. Для экспериментальных растений были смоделированы условия засухи в течении пяти дней. Оценены физиологические параметры стрессированных и контрольных растений (устичная проводимость, относительное влагосодержание

листьев, содержание хлорофилла и активность фотосистемы II). Были подобраны условия для изолирования фракции хлоропластов в градиенте перколя. Из выделенных хлоропластов после лизиса был изолирован белок, который гидролизовали трипсином с применением техники FASP (Filter Aided Sample Preparation). Полученные пептиды были проанализированы на тандемном жидкостном хромато-масспектрометре (nanoLC-MS/MS). Всего было найдено 116 сайтов, несущих модификацию Nε-(ацетил)лизин и Nε-(формил)лизин. В растениях, выращенных в нормальных условиях всего выявлено 39 таких сайтов, из них 13 сайтов Nε-(ацетил)лизина и 27 сайтов Nε-(формил)лизина, тогда как у экспериментальных растений после 5 дней засухи – всего 47 сайтов, из них 20 и 27 сайтов Nε-(ацетил)лизина и Nε-(формил)лизина соответственно. В настоящее время проводится количественная оценка изменений, происходящих по отдельным сайтам. В частности, относительное количественное содержание гликированного пептида DQYIA^YVK_{acetyl}DK, относящегося к большой субъединице RuBisCo увеличилось в 1,5 раза в хлоропластах растений экспериментальной группы по сравнению с контролем.

Таким образом показаны качественные и количественные изменения в протеоме хлоропластов *Nicotiana benthamiana* при стрессе засухой; обсуждается их физиологическая роль, в том числе сигнальная и регуляторная.

НО-опосредованная аутофагия в высших растениях: от идентификации аутофагических генов до посттрансляционной модификации белков

**Мазина А. Б.^{А*}, Газизова Н. И.^А, Даминова А. Г.^А, Лексин И. Ю.^А,
Лукашева Е. М.^Б, Шумилина Ю. С.^Б, Горбач Д. П.^Б, Фролов А. А.^Б,
Минибаева Ф. В.^А**

^А Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия. *E-mail abmazina@gmail.com

^Б Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

^В Институт физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Аутофагия является универсальным механизмом деградации поврежденных или токсичных компонентов во время развития или стрессового ответа в эукариотических клетках. В ходе аутофагии нежелательные компоненты окружаются аутофагосомами (двойными мембранными везикулами), посредством которых эти компоненты доставляются в вакуоли для последующей деградации (Yang, Klionsky, 2009). Нами показано, что в растениях одними из индукторов аутофагии являются активные формы

азота, в том числе оксида азота (NO) (Minibayeva *et al.*, 2023). Одним из ключевых механизмом NO-опосредованной сигнализации является пост-трансляционная модификация (ПТМ) белков посредством S-нитрозилирования. Аутофагия участвует в процессах формирования органов и тканей, биогенеза растительных вакуолей, в процессах старения организма, а также устойчивости к стрессу (Phillips *et al.*, 2008, Tang *et al.*, 2018). В связи с этим, расшифровка механизмов, контролирующих индукцию, развитие или ингибирование аутофагии, может способствовать разработке способов повышения резистентности растительного организма к условиям неблагоприятной среды.

На сегодняшний день в высших сосудистых растениях аутофагические гены и белки довольно хорошо изучены. Этому способствовал полногеномный анализ нескольких видов сосудистых растений, в том числе *Arabidopsis*, *Oryza*, *Zea*. Обратная ситуация наблюдается для пшеницы *Triticum aestivum* – одной из наиболее востребованных в мире сельскохозяйственных культур, чей аллогексаплоидный геном и протеом до сих пор полностью не аннотированы. Представляется важным выявить консервативные участки аутофагических генов и белков у пшеницы и оценить возможную эволюционную древность этих последовательностей.

Генетический механизм аутофагии был систематически расшифрован путем идентификации и функционального анализа более 40 аутофагических (ATG) генов у эукариот (Furukawa *et al.*, 2019). Геномы растений кодируют множество ATG ортологов, идентифицированных у дрожжей и млекопитающих. ATG белки традиционно делят на четыре белковых кластера: 1) киназный комплекс ATG1/ATG13, который инициирует образование аутофагосом в ответ на недостаток питания и в ходе онтогенеза; 2) специфический для аутофагии фосфатидилинозитол (PI) 3-киназный комплекс III класса (PI3K); 3) комплекс ATG9, способствующий экспансии фагофора; 4) убиквитин-подобные системы конъюгации ATG8/ATG12, которые действуют во время экспансии и созревания фагофора (Kim *et al.*, 2011).

Для сравнительного анализа аутофагических генов и белков у растений нами были выбраны бриофиты (мохообразные). Бриофиты являются эволюционно древними высшими несосудистыми растениями, промежуточной формой между низшими и высшими сосудистыми растениями. Многие бриофиты являются экстремофилами и способны выживать в чрезвычайно неблагоприятных условиях (Wood *et al.*, 2007). Использование бриофитов в качестве модельных объектов для изучения аутофагии является чрезвычайно перспективным, поскольку выявление различий в морфологических особенностях, экспрессии ATG генов и активности ATG белков, а также биохимических механизмах регуляции данного процесса

в бриофитах и других высших растениях может приблизить нас к пониманию роли аутофагии в процессах роста, развития и устойчивости растений в ходе эволюции.

Для анализа нами был выбран мох *Dicranum scoparium* Hedw., который отличается значительной устойчивостью к действию абиотических стрессовых факторов. До настоящего времени геном мха *D. scoparium* не аннотирован, и последовательности ATG генов в базе данных отсутствуют. На основании имеющихся в базе данных NCBI SRA транскриптомных данных мха *D. scoparium* нами были *in silico* идентифицированы уникальные транскрипты ATG генов, далее их последовательности были подтверждены экспериментально путем клонирования и секвенирования.

Множественное выравнивание последовательностей ATG белков пшеницы, дикранума и других растений выявило высокую гомологию аминокислотных последовательностей и наличие консервативных участков. Стоит отметить, что в аминокислотных последовательностях ключевого аутофагического белка ATG8 пшеницы наблюдались точечные аминокислотные замены, которые сохранялись в нескольких изоформах белка. Филогенетический анализ последовательностей ATG белков бриофитов и высших сосудистых растений на основе полученных множественных выравниваний показал, что последовательности мха *D. scoparim* находятся в одной группе с бриофитами и наиболее близкородственны белкам *Physcomitrella patens*. Это позволяет предположить, что дивергентность изоформ белка ATG8 эволюционно возникла относительно недавно. Таким образом, обнаружено близкое родство ATG белков *D. scoparium* с гомологичными белками других бриофитов, а также близкое родство ATG белков пшеницы с гомологичными белками других высших сосудистых и несосудистых растений.

С целью анализа паттернов влияния NO на аутофагию в клетках высших несосудистых и сосудистых растений нами проводились эксперименты по анализу экспрессии ATG генов, вовлеченных в различные этапы формирования аутофагосом во мхе и пшенице, подвергнутых воздействию доноров NO. Было обнаружено, что во мхе *D. scoparim* действие нитрата и нитрита калия, нитропруssiда натрия и спермина (полиамин) в течение 3 ч стимулировало в несколько раз экспрессию транскриптов изоформ ATG8. Дальнейшее воздействие до 6 ч нитрита калия еще больше повышало уровень экспрессии всех анализируемых транскриптов.

В корнях пшеницы анализ экспрессии ATG генов во временной динамике 3-6-12 ч показал, что доноры NO повышают экспрессию ATG генов при 3 и 6 ч действии, к 12 ч воздействия уровень экспрессии понижался. Интересно, что экспрессия ATG генов под действием спермина имела колоколообразную форму с максимальным уровнем в 6 ч. Таким образом,

можно предположить, что доноры NO вызывают повышение уровня экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие во всех этапах формирования аутофагосомы.

Маркерными белками аутофагии являются белки ATG4 и ATG8. Белки ATG4, принадлежащих к семейству цистеиновых протеаз, и белки ATG8 из семейства убиквитин-подобных белков необходимы для образования аутофагосомальных мембран (Farré, Subramani, 2016). Методом иммунодетекции с использованием поликлональных антител против ATG4 и ATG8 нами было показано накопление белков ATG4 и ATG8 в корнях, подвергшихся воздействию доноров NO. Самый высокий и статистически достоверный уровень ATG4 и ATG8 наблюдался после 3 ч обработки проростков пшеницы спермином. Интересно, что после 3 ч обработки нитритом калия ATG8 визуализировался в делипидированной и липидированной формах, появляющихся на финальных стадиях образования аутофагосом. Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что наиболее эффективным индукторами аутофагии среди NO доноров являются спермин и нитрит калия.

Известно, что белки, вовлеченные в процесс аутофагии, подвергаются разнообразным посттрансляционным модификациям (Agbemaflé *et al.*, 2023). К сожалению, информация о роли NO-опосредованных модификаций, в том числе S-нитрозилирования белков, в регуляции аутофагии чрезвычайно ограничена. S-нитрозилирование – это обратимое преобразование тиоловых групп белков в S-нитрозотиолы. S-нитрозилирование является динамической, обратимой посттрансляционной модификацией, которая регулирует функции многих белков (Lindermayr *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2019). На данный момент аутофагические механизмы, опосредованные S-нитрозилированием белков, активно изучаются на клетках млекопитающих (Montagna *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2019), однако существуют лишь единичные публикации о подобных исследованиях на клетках растений.

Воздействие на интактные корни *T. aestivum* донора NO (нитрит калия) или ингибитора митохондриальной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) антимицина А приводило к накоплению в клетках аутофагосом и повышению экспрессии ATG генов. Биоинформатический анализ выявил наличие сайтов S-нитрозилирования в структуре белков ATG4a, ATG4b, ATG16 (Таблица 1).

Таблица 1

Гипотетические сайты нитрозилирования аутофагических белков *Triticum aestivum*

Белок	Uniprot ID	Гипотетические сайты нитрозилирования
ATG4 ATG4b	C0LP24 U3Q008	48
ATG4.2	C0LP25	50, 101, 289
ATG4a	U3PWQ4	47
ATG16a ATG16b	U3PWS4 U3Q035	391

Методом иммуноцитохимии и иммунопреципитации с использованием моноклональных антител выявлено накопление S-нитрозилированных белков в клетках корней пшеницы при индукции аутофагии. Мы показали, что в корнях пшеницы при действии индукторов аутофагии, напрямую или опосредованно влияющих на уровень оксида азота в клетках, происходит повышение уровня S-нитрозилированных белков. С целью идентификации S-нитрозилированных белков для эффективного поиска белков-кандидатов мы использовали комплексный методический подход, включающий дериватизацию нитрозогруппы с использованием коммерческого набора, идентификацию белков с помощью метода скорострельной протеомики («shotgun») и биоинформатический анализ. С помощью моделирования белок-белковых взаимодействий предсказано вовлечение идентифицированных белков, в т.ч. GAPDH, ABC-транспортера и других, в аутофагические процессы.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что в клетках высших растений NO индуцирует аутофагию, что характеризуется изменениями в уровне экспрессии аутофагических генов и накоплении аутофагических белков. Одной из ключевой ПТМ, регулирующей активность белков, вовлеченных в аутофагические процессы, является их S-нитрозилирование. Можно полагать, что аутофагия в клетках растений является эволюционно древним процессом. Механизмы, опосредованные активными формами азота, являются универсальными для индукции и процессинга аутофагии в высших сосудистых и несосудистых растениях.

Данное исследование выполнено в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Библиографические ссылки

1. Agbemaflle, W. Transcriptional and post-translational regulation of plant autophagy. / W. Agbemaflle, M. M. Wong, D. C. Bassham // Journal of Experimental Botany. – 2023. – V. 74. – № 19. – P. 6006-6022.

2. Farré, J.-C. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast / J.-C. Farré, S. Subramani // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2016. – V. 17. – № 9. – P. 537-552.
3. Furukawa, K. Regulatory Mechanisms of Mitochondrial Autophagy: Lessons From Yeast / K. Furukawa, A. Innokentev, T. Kanki // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – V. 10.
4. Kim, J. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 / J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K.-L. Guan // *Nature Cell Biology*. – 2011. V. 13. – № 2. – P. 132-141.
5. Lindermayr, C. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis / C. Lindermayr, G. Saalbach, J. Durner // *Plant Physiology*. – 2005. – V. 137. – № 3. – P. 921-930.
6. Minibayeva, F. Nitric oxide induces autophagy in *Triticum aestivum* roots / F. Minibayeva, A. Mazina, N. Gazizova, S. Dmitrieva, A. Ponomareva, D. Rakhmatullina // *Antioxidants*. – 2023. – V. 12. – № 9.
7. Montagna, C. To eat, or NOt to eat: S-nitrosylation signaling in autophagy / C. Montagna, S. Rizza, E. Maiani, L. Piredda, G. Filomeni, F. Cecconi // *The FEBS Journal*. – 2016. – V. 283. – № 21. – P. 3857-3869.
8. Niu, L. Proteomic investigation of S-nitrosylated proteins during NO-induced adventitious rooting of cucumber / L. Niu, J. Yu, W. Liao, J. Xie, J. Yu, J. Lv, X. Xiao, L. Hu, Y. Wu // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – № 21.
9. Phillips, A.R. The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana* / A.R. Phillips, A. Suttangkakul, R.D. Vierstra // *Genetics*. – 2008. – V. 178. – № 3. – P. 1339-1353.
10. Tang, H.-W. The TORC1-regulated CPA complex rewires an RNA processing network to drive autophagy and metabolic reprogramming / H.-W. Tang, Y. Hu, C.-L. Chen, B. Xia, J. Zirin, M. Yuan, J.M. Asara, L. Rabinow, N. Perrimon // *Cell Metabolism*. – 2018. – V. 27. – № 5. – P. 1040- 1054.e8.
11. Yang, Z. An overview of the molecular mechanism of autophagy / Z. Yang, D.J. Klionsky *Autophagy in Infection and Immunity* / Ed. B. Levine // Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, – 2009. – P. 1–32.
12. Wood, A.J. The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses / A. J. Wood // *The Bryologist*. – 2007. – V. 110. – № 2. – P. 163-177.
13. Zhu, L. PTEN S-nitrosylation by NOS1 inhibits autophagy in NPC cells / L. Zhu, C. Zhang, Q. Liu // *Cell Death & Disease*. – 2019. – V. 10. – № 4. – P. 306.

Влияние цинк-солюбилизирующих PGP-ризобактерий и опрыскивания йодом на редокс-реакции в листьях гороха (*Pisum sativum* L. сорт Мадрас)

Малева М. Г.^{A*}, Борисова Г. Г.^A, Ахамуэфуле К. Ч.^A, Дарказанли М.^A

^A *Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия. *E-mail: maria.maleva@mail.ru*

Изучение растительно-микробных взаимодействий позволяет предложить цельную стратегию экологически устойчивого растениеводства,

основанную на использовании бактериальных препаратов, выступающих в качестве стимуляторов роста и дополнительного источника эссенциальных элементов у растений [1; 2]. В основе создания таких биоудобрений лежит использование ростстимулирующих бактерий (от англ. “Plant Growth Promoting”, PGP), среди которых особое место занимают ризосферные микроорганизмы (PGPR). Прямое действие PGPR на рост растительных организмов связывают с такими PGP-свойствами, как способность к фиксации молекулярного азота и производству аммиака, повышение доступности для растений элементов минерального питания (за счет солюбилизации нерастворимых соединений фосфора, калия, цинка и пр.), продукция сидерофоров и фитогормонов, а также повышение устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессорам [2; 3]. Принцип действия бактериальных препаратов отличается от классических химических средств защиты, так как их целью является не уничтожение, а регулирование численности патогенных микроорганизмов за счет конкурентных взаимоотношений, а также индуцирование системной устойчивости у растений [4; 5]. Многие бактерии являются катализаторами редокс-реакций в почве, что приводит к изменению подвижности отдельных элементов и их корневому поглощению растениями. Более того, PGPR могут становиться триггерами, запускаящими каскад защитных реакций у растительных организмов, производя метаболиты различной химической природы, в том числе и антиоксиданты [6].

Среди дефицитных эссенциальных элементов особое место занимают цинк и йод [7]. Цинк (Zn) является жизненно важным микроэлементом для растений из-за его роли в качестве структурного компонента и регуляторного кофактора большого количества ферментов, участвующих во многих биохимических путях. Дефицит Zn приводит к значительным потерям урожайности сельскохозяйственных культур с потенциальной опасностью для здоровья человека из-за снижения его поступления в рацион [8]. Проблемы, связанные с неполноценным питанием из-за дефицита Zn, уже имеют системный характер и вызывают серьезную озабоченность по всему миру [9]. Цинк-соллюбилизирующие PGPR могут помочь преодолеть нехватку этого микроэлемента, превращая нерастворимые соединения Zn в доступные для растений [10]. Йод (I) также принимает участие в важных процессах обмена веществ у растений. У человека дефицит I вызывает неадекватный синтез гормона щитовидной железы, который выполняет множество функций, таких как активизация синтеза белка, регулирование передачи энергии, ускорение роста и развития и поддержание центральной нервной системы [11]. Йод не является необходимым для растений, но может считаться полезным, поскольку благодаря своим ан-

тиоксидантным свойствам этот элемент способен защищать их от окислительного стресса и в определенных концентрациях может служить стимулятором роста [12]. Эксперименты по обогащению культурных растений разными формами йода проводились либо путем добавления их в почву, либо внекорневым опрыскиванием [13]. Однако, несмотря на свой потенциал, микробиологическая биофортификация не нашла широкого применения, а влияние комбинированного биообогащения на редокс-баланс у культурных растений остается недостаточно изученным, что определило цель нашего исследования. Цель работы – изучить влияние инокуляции Zn-солубилизирующими PGPR совместно с внекорневой обработкой одной из двух форм йода (KI или KIO₃) на редокс-реакции в листьях гороха (*Pisum sativum* L. сорт Мадрас).

Материалы и методы исследования. Сорт гороха «Мадрас» (происхождение: «TOFT PLANT BREEDING APS», Дания) относится к средне-поздним сортам усатой формы, устойчив к полеганию и растрескиванию бобов, включён в Госреестр по Центральному и Центрально-Чернозёмному регионам. Сорт является ценным по качеству семян, которые используются для получения продовольственного зерна. Широко выращивается в коммерческих целях в качестве микрозелени, что обусловило выбор этого сорта в качестве объекта исследования.

Бактериальные культуры были предварительно выделены из ризосферы *Tussilago farfara* L. (сем. Asteraceae), произрастающей на территории Сафьяновского медно-цинково-колчеданного месторождения (г. Реж, Свердловская область). В общей сложности было выделено около 150 изолятов, из которых было отобрано два штамма с высокой устойчивостью к цинку (до 2 г/л на агаризованной среде Лурия-Бертани, LB) и железу (до 9 г/л), а также наилучшими Zn-солубилизирующими и сидерофор продуцирующими способностями. Отобранные штаммы первоначально были идентифицированы как принадлежавшие родам *Pantoea* sp. STF1 и *Pseudomonas* sp. STF13 на основе морфологических, физиологических и биохимических тестов, а затем с помощью секвенирования генома 16S рРНК [14]. Далее было проведено их тестирование на дополнительные PGP-способности и устойчивость к йодиду (KI) и йодату (KIO₃) калия. Оба штамма обладали высокой способностью к солубилизации фосфатов (115,3 и 289,2 мг PO₄³⁻/л, соответственно для STF1 и STF13) и синтезу индолил-3-уксусной кислоты, ИУК (10,3 и 14,3 мг/л, соответственно). Йодный тест не выявил неблагоприятного влияния KI и KIO₃ на рост исследуемых культур даже при концентрации 0,1%. Отобранные штаммы использовали в дальнейших вегетационных опытах на *P. sativum*. Зрелые семена гороха подвергали поверхностной стерилизации (70% этанол в течение 30

с, затем 2 мин 4% гипохлорит натрия), несколько раз промывали стерильной дистиллированной водой и оставляли на ночь для набухания. На следующий день семена инокулировали отобранными штаммами PGPR в течение 1–2 часов. Для этого отобранные культуры бактерий предварительно культивировали на LB-среде до концентрации не менее 10^8 КОЕ/мл, клетки бактерий отделяли от среды центрифугированием и разводили в стерильной дистиллированной воде. Контролем служили неинокулированные семена гороха, замоченные в стерильной дистиллированной воде. После этого семена высаживали на предварительно дважды автоклавированный (130°C) нейтрализованный торфяной субстрат (производитель ГК «Селигер-Агро», Тверь, Россия) в пластиковые контейнеры объемом 3 л (по 100 семян в каждый, 3 контейнера на один вариант). На 7-й день вегетации сеянцы опрыскивали 0,01% водным раствором KI или KIO_3 . Эту процедуру далее повторяли дважды на 9 и 11 день. Через 21 день вегетации композитные навески срединных листьев гороха из каждого варианта эксперимента использовали для спектрофотометрического (PD-303UV, «APEL», Япония) измерения содержания прооксидантов (пероксида водорода и малонового диальдегида, МДА), низкомолекулярных антиоксидантов (каротиноидов, свободного пролина, растворимых фенольных соединений, включая флавоноиды), а также активности гваякол-пероксидазы. Содержание пероксида водорода (H_2O_2) измеряли при 560 нм после реакции с ксиленоловым реактивом; количество МДА измеряли при 532 и 600 нм после реакции с тиобарбитуровой кислотой [15]. Содержание фотосинтетических пигментов определяли при 470, 647, 663 нм после экстракции в 80% ацетоне; содержание каротиноидов рассчитывали по Lichtenthaler [16]. Содержание пролина определяли по модифицированной методике [17] после экстракции в горячей воде (95°C) и дальнейшего кипячения на водяной бане в течение 20 мин. Для окрашивания использовали смесь нингидринового реактива с ледяной уксусной кислотой (1:1, v/v); оптическую плотность измеряли при длине волны 520 нм. В качестве стандарта использовали раствор пролина известной концентрации. Суммарное содержание растворимых фенольных соединений, в том числе флавоноидов, определяли в 80%-ном спиртовом экстракте. Содержание растворимых фенолов измеряли при 725 нм после реакции с 0,1 н реактивом Folin-Ciocalteu [15]. В качестве стандарта использовали галловую кислоту. Содержание флавоноидов определяли в том же экстракте при 420 нм после 15-мин реакции с 10%-м раствором AlCl_3 (1:1, v/v) [18]. В качестве стандарта использовали раствор рутина. Содержание низкомолекулярных про- и антиоксидантов пересчитывали на сухую биомассу листьев. Для определения активности гваякол-пероксидазы навески свежих листьев (0,2 г) растирали в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0) и

центрифугировали 15 мин, 14000 g. Активность фермента оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола [15] и рассчитывали в ммоль окисленного гваякола на мг белка в мин. Количество растворимого белка определяли по Bradford [15]. Измерения проводили в 4-х биологических и 3-х аналитических повторностях. После оценки нормальности распределения, значимость различий между вариантами оценивали с использованием апостериорного критерия Дункана; корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента Пирсона. Для определения отдельного и совместного влияния двух факторов (инокуляции бактериальными штаммами и опрыскивания йодом) был использован дисперсионный анализ (two-way ANOVA, Statistica 13.0). На рисунке представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки, разными латинскими буквами обозначены достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$.

Основные результаты и их обсуждение. Измерение содержания МДА уже давно используется в качестве маркера перекисного окисления липидов (ПОЛ) в исследованиях, связанных с окислительным стрессом и редокс-сигналингом, особенно в тех исследованиях, которые направлены на изучение реакций растений на абиотические и биотические воздействия [19]. Известно, что в результате неблагоприятного действия факторов внешней среды, в клетках растений могут активизироваться прооксидантные процессы, что приводит к значительному увеличению активных форм кислорода (АФК) и накоплению МДА. В нашем эксперименте инокуляция гороха отобранными штаммами PPGR не оказывала влияния на содержание МДА (рис. 1а), однако приводила к небольшому (в среднем на 18%), но достоверному возрастанию количества пероксида водорода (рис. 1б).

Известно, что H_2O_2 является не только высокореакционной АФК, вызывающей окислительный стресс у растений, но может выступать как вторичный мессенджер, участвующий в регуляции сигнальных путей и транскрипционных факторов [5; 20; 21]. Пероксиды играют важную роль в клеточной пролиферации, дифференцировке и клеточном апоптозе [20; 21]. Дополнительное опрыскивание йодом, особенно в форме KI, приводило к достоверному снижению содержания МДА. Это проявлялось в большей степени у неинокулированных растений (в 1,3 раза), чем у инокулированных (в среднем в 1,2 раза). Что касается H_2O_2 , то опрыскивание гороха одной из форм йода также приводило к снижению его количества до контрольных значений (рис. 1б).

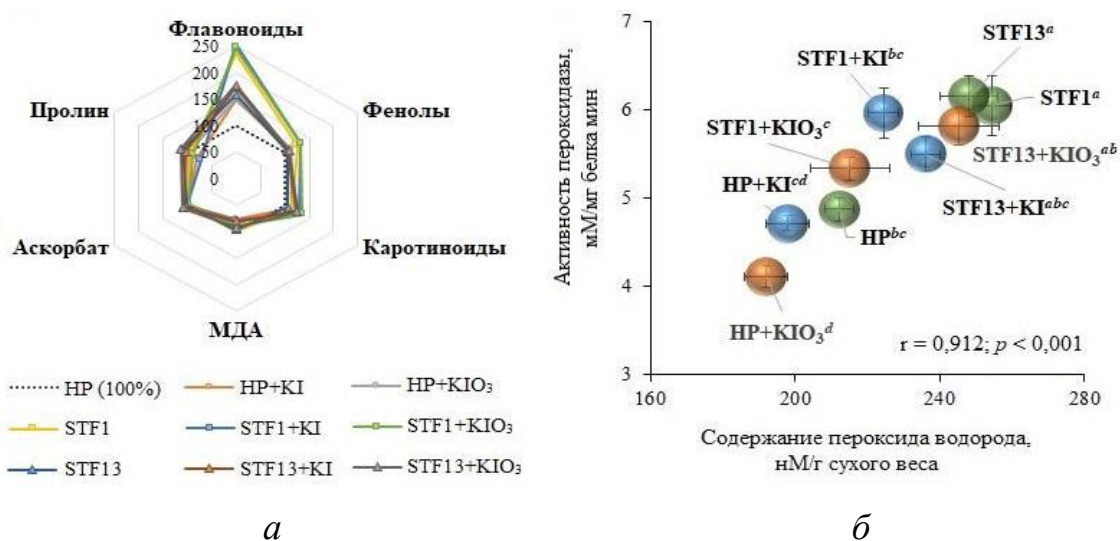


Рис. 1. Влияние двух штаммов PGPR (*Pantoea* sp. STF1 и *Pseudomonas* sp. STF13) и опрыскивания 0,01% KI или KIO₃ на относительное содержание (в процентах от контроля) низкомолекулярных про- и антиоксидантов (а) и активность гваякол-пероксидазы в зависимости от содержания H₂O₂ (б) в листьях гороха. НР – неинокулированные растения. Разными буквами отмечены достоверные различия при $p < 0.05$

Накопление МДА и других продуктов ПОЛ может служить, с одной стороны, индикаторной реакцией, отражающей степень стрессового воздействия, с другой – сигналом для экспрессии генов ряда антиоксидантных ферментов и неэнзиматических антиокислителей [21]. Одним из основных неспецифических путей формирования устойчивости растений является активизация системы антиоксидантной защиты. Важными компонентами этой системы являются низкомолекулярные антиоксиданты (например, пролин и фенольные соединения), а также ферменты-антиоксиданты, к которым относятся растительные пероксидазы [21].

Пролин, играет очень важную роль у растений, подверженных различным стрессовым воздействиям. Помимо того, что пролин действует как отличный осмолит, он может выступать хелатором металлов, участвовать в антиоксидантной защите и играть роль сигнальной молекулы [21]. Обнаружено, что только инокуляция гороха *Pseudomonas* sp. STF13 приводила к небольшому (на 11%), но достоверному увеличению содержания пролина в листьях (рис. 1а). Обработка йодом, особенно в форме KI, у инокулированных этим штаммом растений не оказывала существенного влияния на его содержание, тогда как в случае неинокулированных и инокулированных *Pantoea* sp. STF1, приводила к достоверному снижению (в среднем на 24%). Содержание фенолов и флавоноидов в листьях гороха также зависело от обоих факторов (рис. 1а). Количество растворимых фенолов достоверно увеличивалось лишь у растений, инокулированных

штаммом STF1 (на 25%). Опрыскивание йодом также стимулировало синтез фенолов, однако достоверный эффект был обнаружен лишь у инокулированных растений (на 11%) и инокулированных STF1 (в 1,3 раза). Содержание флавоноидов оказалось более чувствительным к действию обоих факторов (рис. 1а). У инокулированных растений гороха количество флавоноидов значительно увеличивалось – в 2,4 раза в случае STF1 и в 1,6 раз при действии STF13. При этом доля флавоноидов от общего содержания растворимых фенольных соединений возрастала от 50% у контрольных сеянцев, до 94% – в случае STF1 и 76% – в случае STF13. Внекорневая обработка йодом также оказывала положительное влияние на накопление этих низкомолекулярных антиоксидантов, особенно у неинокулированных растений (в среднем в 1,5 раза). Исследование активности растительной пероксидазы в листьях гороха (рис. 1б) показало ее прямую зависимость от содержания пероксида водорода ($r = 0,912$ при $p < 0,001$). Инокуляция гороха Zn-солубилизирующими PGPR достоверно повышала активность гваякол-пероксидазы (в среднем на 25%). Обработка йодом при этом не оказывала существенного воздействия. Результаты дисперсионного анализа подтвердили высокую значимость как влияния PGPR, так и внекорневой обработки одной из форм йода на большинство редокс-реакций у гороха ($p < 0,001$). Однако совместное действие факторов было значимым только для содержания флавоноидов ($p = 0,003$).

Таким образом, инокуляция гороха Zn-солубилизирующими PGPR (*Pantoea* sp. STF1 и *Pseudomonas* sp. STF13), особенно при опрыскивании одной из форм йода (KI или KIO₃), снижала количество продуктов ПОЛ (малонового диальдегида), стимулировала синтез низкомолекулярных антиоксидантов (фенолов и флавоноидов) и активировала растительную пероксидазу. Возрастание количества пероксида водорода в листьях инокулированных сеянцев гороха свидетельствует о важной роли этой молекулы в индуцировании системной устойчивости у растений. Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 23-26-00292, <https://rscf.ru/project/23-26-00292/>.

Библиографические ссылки

1. García-Fraile, P. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry / P. García-Fraile, E. Menéndez, R. Rivas // AIMS Bioengineering. – 2015. – Vol. 2. – P. 183–205.
2. Dhuldhaj, U. Implementation of biofortification technology by using PGPR for sustainable agricultural production / U. Dhuldhaj, U. Pandya / Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture // Ed. V. Meena, P. Mishra, J. Bisht, A. Pattanayak. Singapore, Springer. – 2017.
3. Rana, A. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria / A. Rana [et al.] // Europ. J. Soil Biol. – 2012. – Vol. 50. – P. 118–126.

4. Bhattacharyya, P.N. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture / P.N. Bhattacharyya, D.K. Jha // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 28, № 4. – P. 1327–1350.
5. Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И.В. Максимов [и др.] // *Физиология растений.* – 2015. – Т. 62, № 6. – С. 763–775.
6. Gray, E.J. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes / E.J. Gray, D.L. Smith // *Soil Biol. Biochem.* – 2005. – Vol. 37, № 3. – P. 395–412.
7. White, P.J. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine / P.J. White, M.R. Broadley // *New Phytol.* – 2009. – Vol. 182. – P. 49–84.
8. Cakmak, I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification / I. Cakmak // *Plant Soil.* – 2008. – Vol. 302. – P. 1–17.
9. Godfray, J. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People / J. Godfray // *Science.* – 2010. – Vol. 327. – P. 812–818.
10. Sunithakumari, K. Zinc solubilizing bacterial isolates from the agricultural fields of Coimbatore / K. Sunithakumari, S.N. Padma Devi, S. Vasandha // *Curr. Sci.* – 2016. – Vol. 110, № 2. – P. 196–205.
11. Medrano-Macías, J. Use of iodine to biofortify and promote growth and stress tolerance in crops / J. Medrano-Macías [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7. – 1146.
12. Golubkina, N. Joint biofortification of plants with selenium and iodine. New field of discoveries / N. Golubkina [et al.] // *Plants.* – 2021. – Vol. 10. – 1352.
13. Melse-Boonstra, A. Iodine deficiency in pregnancy, infancy and childhood and its consequences for brain development / A. Melse-Boonstra, N. Jaiswal // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 29–38.
14. Voropaeva, O.V. Plant growth promoting activity and metal tolerance of bacteria isolated from rhizosphere of the orchid *Epipactis atrorubens* growing on serpentine substrates of the Middle Urals / O.V. Voropaeva [et al.] // *J. Sib. Fed. Univ. Biology.* – 2022. – Vol. 15, № 3. – P. 297–313.
15. Методы оценки антиоксидантного статуса растений : учеб.-метод. пособие / Г.Г. Борисова и др.; отв. ред. Н. В. Чукина. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. – 2012. – 72 с.
16. Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes / H.K. Lichtenthaler // *Method. Enzymol.* – 1987. – Vol. 148. – P. 350–382.
17. Калинкина, Л.Г. Модифицированный метод выделения свободных аминокислот и их определение на аминокислотном анализаторе / Л.Г. Калинкина, Л.В. Назаренко, Е.Е. Гордеева // *Физиология растений.* – 1990. – Т. 37, № 3. – С. 617–621.
18. Chang, C.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods / C.C. Chang // *J. Food Drug Anal.* – 2002. – Vol. 10. – P. 178–182.
19. Melanie, M. Malondialdehyde: Facts and Artifacts / M. Melanie, S. Munné-Bosch // *Plant Physiol.* – 2019. – Vol. 180, № 3. – P. 1246–1250.
20. Ткачук, А. Пероксид водорода как новый вторичный посредник / А. Ткачук [и др.] // *Биологические мембраны.* – 2012. – Т. 29, № 1–2. – С. 21–37.
21. Креславский, В.Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В.Д. Креславский [и др.] // *Физиология растений.* – Т. 59, № 2. – С. 163–163.

Редокс-статус и формирование аэренхимы в корне ячменя при гипоксии

Малыгин М. В.^А, Показаньева М. В.^А, Тугбаева А. С.^А,
Янушкевич М. А.^А, Киселева И. С.^{А*}

^А Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия. *E-mail: i.s.kiseleva@urfu.ru

Дефицит кислорода в почве часто возникает при избытке воды в ней, что создает гипоксичные условия для организмов, в том числе, корней растений. Это приводит к торможению дыхания и нарушению всех энергозатратных процессов [1]. Длительный период гипоксии или аноксии может привести к гибели корней, а затем и всего растения [2], не только из-за изменения энергетического метаболизма, но и редокс-статуса клеток [3]. Изучение действия гипоксии на растения и механизмов приспособления к ней являются актуальными в связи с существенными погодными флуктуациями [4]. Особый интерес может представлять изучение ответных реакций на гипоксию у сельскохозяйственных растений. Среди них есть традиционно растущие в условиях затопления и имеющие эволюционные адаптации, например рис, сахарный тростник, некоторые озимые злаки. Однако важно изучать механизмы приспособления и тех растений, которые не имеют таких эволюционных адаптаций и вынуждены формировать специальные механизмы выживания при гипоксическом стрессе.

Одним из способов преодолеть недостаток кислорода является формирование аэренхимы. Её генезис в условиях гипоксии в общих чертах известен, но многие детали до сих пор остаются неясными. Например, установлено, что этилен индуцирует образование лизигенной аэренхимы у злаков, но механизмы лизиса клеток и его контроля не до конца понятны [5]. В литературе есть немногочисленные данные о возможной роли салициловой кислоты (СК) в этом процессе [6].

Настоящее исследование направлено на изучение редокс-статуса растений ячменя в условиях гипоксии и на выявление возможных механизмов формирования аэренхимы у них в качестве приспособления к этому неблагоприятному явлению. Были изучены изменения корней при гипоксии в гидропонном эксперименте, маркеры стресса, ферменты антиоксидантной защиты, определено участие салициловой кислоты в формировании лизигенной аэренхимы.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлся яровой ячмень (*Hordeum vulgare* L., сорт «Памяти Чепелева»). Эксперимент проводили в гидропонных системах с аэрацией (нормоксия) и без аэрации (гипоксия) питательной среды Хогланда, с добавлением салици-

ловой кислоты (10^{-5} М/л) или без нее. Содержание кислорода в аэрируемой среде составило 8-10 мг/л, в неаэрируемой – 0.5-2.5 мг/л. Растения выращивали до фазы 4 листьев (25–28 день от замачивания семян). Измерения показателей проводили на 8-9 и 25–28 дни [7]. У растений измеряли длину побегов и семенных корней. Поперечные срезы базальной части корня изучали с использованием сканирующего электронного микроскопа EVO LS 10 (Carl Zeiss, Германия). Содержание супероксид анион-радикала [8], пероксида водорода [9] и МДА [10]; активность гваяколовой (ГПО) [11], бензидиновой (БПО) [12] и аскорбат-пероксидазы (АПО) [13] измеряли в базальной зоне семенных корней спектрофотометрически. Статистическая обработка выполнена в программе Statistica 13 с использованием критерия Тьюки для неравных объёмов выборки для $p < 0.05$ (TIBCO Inc., USA).

Результаты и их обсуждение. Гипоксия не влияла на длину и биомассу побега, поскольку он находился в воздушной среде, а рост корней угнетался (рис. 1), что показано и в других работах [14]. СК незначительно снижала рост корней в условиях гипоксии, но не побегов (рис. 1). Подавление роста корней при гипоксии обусловлено снижением интенсивности дыхания в них (рис.2А) и, вероятно, усилением анаэробных путей метаболизма [1, 15].

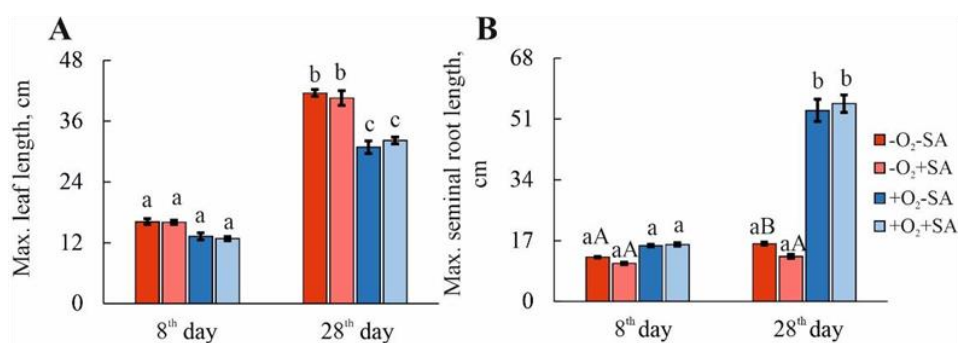


Рис. 1. Длина побегов (А) и корней (В) у ячменя в условиях гипоксии и нормоксии. Разными буквами отмечены достоверные различия ($n=7$; $p < 0.05$).

Ячмень, как и другие злаки, использует стратегию избегания гипоксии с помощью формирования аэренхимы [4], которая выполняет функцию снабжения корней кислородом [5]. В нормальных условиях аэренхима в корнях не образовывалась (рис.2 Е, F, I, J) на протяжении 28 дней, тогда как при гипоксии она формировалась уже на 8 день роста ячменя (рис.2 С, D). СК в молодых корнях усиливала формирование аэренхимы, но затем ее объемы в присутствии СК не росли (рис. 2 В, D, Н). Доля проективной поверхности аэренхимы в вариантах без СК с возрастом увеличивалась. Вероятно, салициловая кислота в первые дни роста в условиях гипоксии являлась триггером образования аэренхимы. В последующие

дни СК тормозила формирование воздушных полостей. Подобный эффект наблюдали у пшеницы при обработке салицилатом [6].

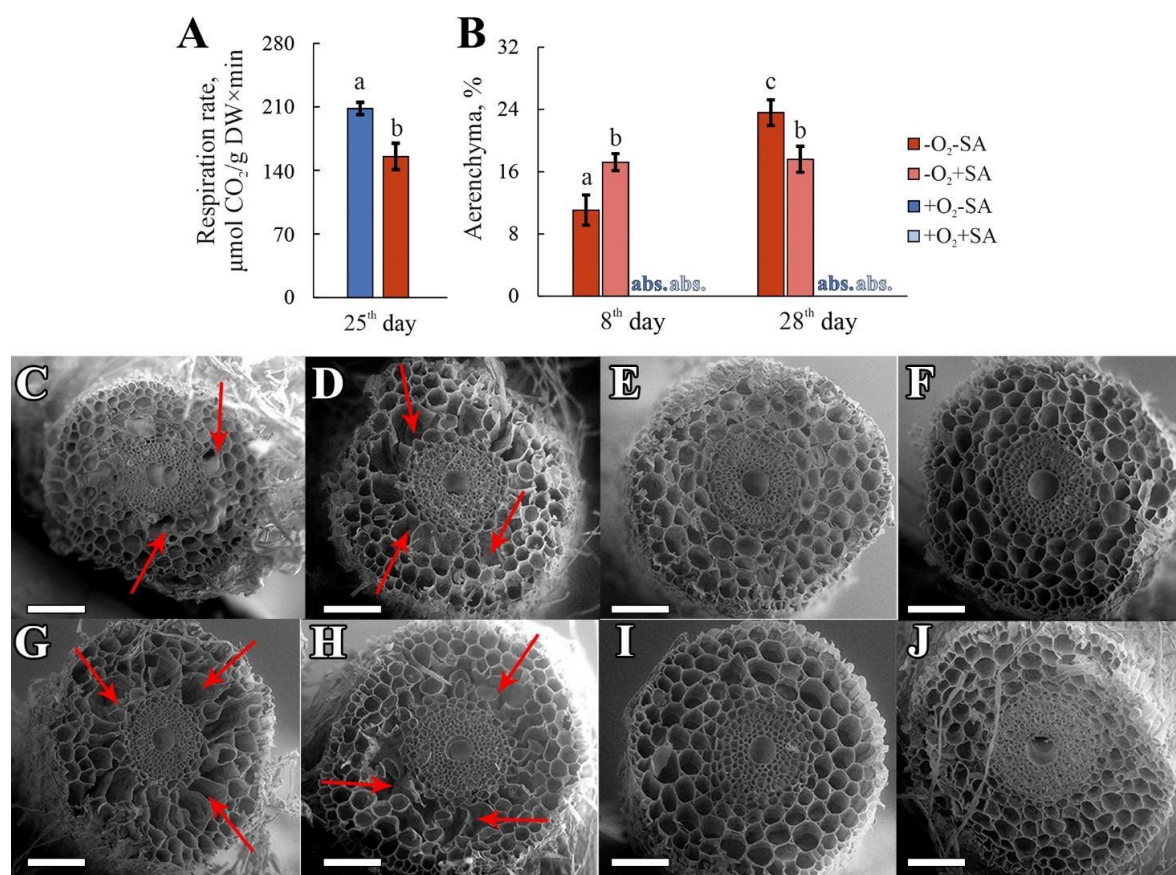


Рис. 2. Интенсивность дыхания корней (А, n=5) и парциальный объем аэренхимы (В, n=10); срезы базальной части семенных корней 8-дневных (С–F) и 28-дневных растений (G–J) в условиях гипоксии без обработки СК (С, G) и с СК (D, H), а также в условиях нормоксии без СК (Е, I) с СК (F, J). Разными буквами отмечены достоверные различия ($p < 0.05$). Стрелками отмечены аэренхимные лакуны

Подавление роста корней при гипоксии является следствием стресса. При любом виде стресса у растений происходит окислительный взрыв [15]. В наших экспериментах на 8 день роста у гипоксичных растений содержание таких АФК как супероксид анион-радикал и пероксид водорода было больше (рис. 3 А, В), чем при нормоксии. На 28 день различия у аэрируемых и неаэрируемых растений были выражены слабее, что, вероятно, связано с развитием антиоксидантных реакций [16]. СК при стрессе способствовала росту содержания супероксид анион-радикала в первые 18 дней, а пероксида водорода с 18 по 28 день (рис. 3 А, В). Такой характер изменений, вероятно, обусловлен тем, что пероксид водорода является продуктом разрушения супероксид анион-радикала ферментом супероксиддисмутазой.

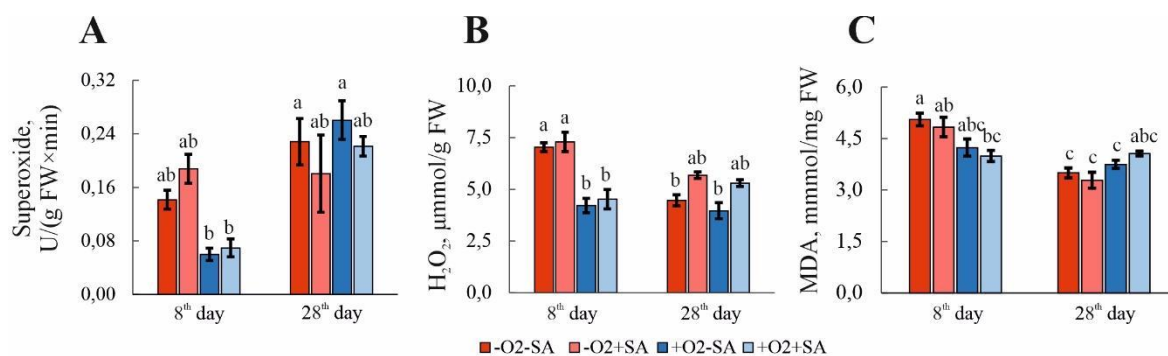


Рис. 3. Содержание супероксид анион-радикала (А; $n=3$), пероксида водорода (В; $n=3-5$); и МДА (С; $n=3-4$) в базальной зоне корней ячменя при нормоксии и гипоксии, в присутствии СК и без СК. Разными буквами отмечены достоверные различия ($p<0.05$)

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гипоксичных условиях была выше только у молодых корней (рис. 3С). В более зрелых корнях различий между контролем и опытом не было, вероятно, в связи с развитием аэренхимы. СК не влияла на интенсивность ПОЛ.

Антиоксидантные ферменты – важные элементы защиты при стрессах [15]. Активность гваяколовой (ГПО), бензидиновой (БПО) и аскорбат (АПО) пероксидаз была выше в корнях растений в условиях гипоксии в сравнении с аэрируемыми условиями (рис. 4). При добавлении СК у гипоксических растений активность всех трех изученных пероксидаз возрастала. В аэрируемых условиях СК не вызвала достоверного изменения активности, кроме ГПО (рис. 4).

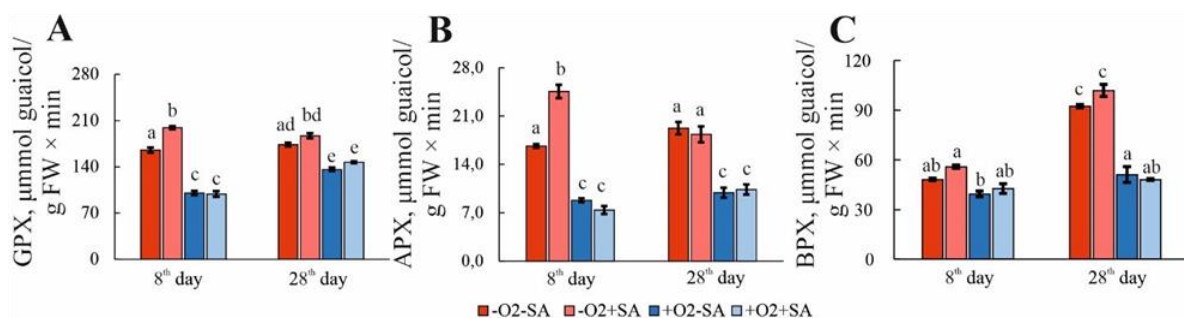


Рис. 4. Активность ферментов антиоксидантной защиты: А) ГПО; В) АПО; С) БПО. Разными буквами отмечены достоверные различия ($n=4$; $p<0.05$).

Известно, что аэренхима в корнях ячменя является лизигенной [17]. Ее образование индуцируется гипоксией, которая стимулирует вакуоль-опосредованную гибель клеток. За апоптотическую гибель клеток растений отвечают протеиназы с каспазоподобной активностью. Выдвинуто предположение, что субъединица протеасомы $\beta 2$ (ген *HvPBB*) проявляет

активность, подобную каспазе-3 животных [18]. В наших опытах в условиях гипоксии в сравнении с аэрируемыми экспрессия гена *HvPBB* возрастала в базальной части корня в 8,1 раза, что дает возможность предположить участие этого гена в формировании лакун аэренхимы за счет апоптоза.

Закключение. Гипоксия, моделируемая в гидропонных условиях, вызывала у ячменя угнетение роста корней, скорости дыхания, а также приводила к значительному увеличению содержания АФК в первую неделю эксперимента. В условиях гипоксии у растений формировалась аэренхима, и происходило увеличение активности антиоксидантных ферментов, которые «гасили» активные формы кислорода, генерируемые при стрессе. Эти адаптивные механизмы способствовали уменьшению содержания активных форм кислорода и интенсивности ПОЛ, что обеспечивало выживаемость растений в условиях гипоксии, по крайней мере, до 28 дня культивирования. Аэренхима не формировалась в аэрируемых условиях в корнях ячменя независимо от наличия в среде салициловой кислоты. В гипоксических условиях формирование аэренхимы происходило уже на 8 день выращивания растений, и с возрастом ее доля от проективной поверхности коры возрастала с 12% до 20%. Таким образом, аэрация растворов в условиях гидропонного выращивания растений помогала избегать гипоксического стресса.

Салициловая кислота только в первые дни роста усиливала образование аэренхимы, и, возможно, являлась триггером этого процесса. Добавление СК в гипоксических условиях вызывало рост содержания АФК, особенно заметный на 18 день культивирования растений. В присутствии салициловой кислоты активность пероксидаз возрастала, что приводило к снижению содержания АФК и акклимации растений к условиям дефицита кислорода. Результаты, полученные в нашем исследовании, позволяют также подтвердить роль салициловой кислоты как возможного вторичного мессенджера в НАДФН-оксидазной системе, активируемой при гипоксии.

Таким образом, в условиях гипоксии в корнях ячменя меняется редокс-статус, формируется комплекс анатомо-морфологических и физиолого-биохимических механизмов, что позволяет растению акклиматизироваться в условиях стресса.

Библиографические ссылки

1. Aeration in higher plants / W. Armstrong // *Advances in Botanical Research*. – 1979. – № 7. – P. 225-332.
2. The Many Facets of Hypoxia in Plants / E. Loreti, P. Perata // *Plants*. – 2020. - V. 9, № 6. – P. 745.

3. Making sense of low oxygen sensing / J. Bailey-Serres [et al.] // *Trends in Plant Science*. – 2012. – Vol. 17, № 3. – P. 129-138.
4. Flood adaptive traits and processes: an overview / L. A. C. J. Voesenek, J. Bailey-Serres // *New Phytologist*. – 2015. – Vol. 206, № 1. – P. 57-73.
5. Aerenchyma Formation in Plants / H. Takahashi [et al.] // in *Low-Oxygen Stress in Plants: Oxygen Sensing and Adaptive Responses to Hypoxia*, eds. J. T. van Dongen, F. Licausi – Vienna: Springer Vienna, 2014. – pp. 247-265.
6. Salicylic Acid Enhances Adventitious Root and Aerenchyma Formation in Wheat under Waterlogged Conditions / M. K. Koramutla, P. A. Tuan, B. T. Ayele // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 3. – P. 1243.
8. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f / K. S. K. Chaitanya, S. C. Naithani // *New Phytologist*. – 1994. – Vol. 126, № 4. – P. 623-627.
9. Extracellular H₂O₂ Induced by Oligogalacturonides Is Not Involved in the Inhibition of the Auxin-Regulated rolB Gene Expression in Tobacco Leaf Explants1 / D. Bellincampi [et al.] // *Plant Physiology*. – 2000. – V. 122, № 4. – P. 1379-1386.
10. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // *Analytical Biochemistry*. – 1978. – V. 86, № 1. – P. 271-278.
11. The Assay of Catalases and Peroxidases / A. C. Maehly // in *Methods of Biochemical Analysis*, ed. D. Glick. – 1954. – pp. 357-424.
12. Further observations on the peroxidatic activities of microbodies (peroxisomes) / S. Goldfischer, E. Essner // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 1969. – V. 17, № 10. – P. 681-685.
13. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // *Plant and Cell Physiology*. – 1981. – V. 22, № 5. – P. 867-880.
14. Opportunities for Improving Waterlogging Tolerance in Cereal Crops-Physiological Traits and Genetic Mechanisms / C. Tong [et al.] // *Plants* (Basel, Switzerland). – 2021. – V. 10, № 8. – P. 1560.
15. Физиологические основы устойчивости растений / Чиркова Т. В. – Санкт-Петербург: Изд-во С.-Петер. Ун-та, 2002. – pp. 244.
16. Mechanisms of lysigenous aerenchyma formation under abiotic stress / T. Yamauchi, M. Nakazono // *Trends in Plant Science*. – 2022. – V. 27, № 1. – P. 13-15.
17. Aerenchyma formation: Tansley review / D. E. Evans // *New Phytologist*. – 2004 – V. 161 – № 1 – P. 35-49
18. The proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem development / J. J. Han [et al.]. // *The Plant Journal*. – 2012 – V. 72 – № 1 –P. 129-141.

Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов *Salvia coccinea* в разных фенологических состояниях

Матыков Н. Е.^А, Лотоцкий С. О.^А, Ермошин А. А.^{А*}

^А Уральский федеральный университет имени первого президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия. *E-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Род Шалфей – *Salvia* L. семейства Яснотковые (*Lamiaceae* Lindl.), по данным Plants of the World Online на май 2024 года, включает 1049 видов [1]. Отдельные виды применяются в качестве лекарственного сырья. Например, листья шалфея лекарственного используют в качестве антибактериального и противовоспалительного средства [2].

В последнее время внимание уделяется антиоксидантным свойствам растительного сырья. При воздействии стрессоров на организм увеличивается продукция активных форм кислорода и возникает состояние окислительного стресса. В литературе встречаются данные о высокой антиоксидантной и антирадикальной активностях экстрактов *Salvia officinalis* [3].

На сегодняшний день одним из малоизученных видов является шалфей ярко-красный (*Salvia coccinea*), который потенциально может являться источником биологически активных веществ [4].

В работе использовали листья и стебли растений *S. coccinea* (сальвия красная, сорт «Кардинал», семена агрофирмы «Аэлита», РФ). Исследуемый растительный материал высушивали и готовили из него водный и этанольный (70 %) экстракты; соотношение материала к экстрагенту 1:10. Использовали стандартный методом исчерпывающей экстракции.

Сумму фенольных соединений определяли спектрофотометрически с реактива Фолина-Чокальтеу, рассчитывали на галловую кислоту. Флавоноиды – по реакции с раствором $AlCl_3$, в расчете на рутин [5]. Дубильные вещества – фармакопейным методом перманганатометрического титрования. Антирадикальную активность определяли спектрофотометрически, с применением $ABTS^{+•}$ (650 нм) и $DPPH^{•}$ (540 нм) [5]. Восстановительный потенциал определяли по реакции восстановления феррицианида калия до ферроцианида с последующим образованием берлинской лазури при добавлении раствора $FeCl_3$ [6]. Восстановление ионов железа – по реакции с о-фенантролином. Определение антибактериальной активности. Использовали метод диффузии экстракта в агар, измеряли стерильную зону, после посева тест-культуры (*Escherichia coli* штамм DH10B) [7]. Определение цитотоксической активности. Проводили МТТ-тест на линиях клеток Vero и HepG2, после культивирования на среде с добавлением 5% экстракта [8].

Статистическая обработка. Анализ проводили в Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics 27. Измерения выполняли в пяти повторностях. Для

установления достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни и однофакторный дисперсионный анализ Краскала-Уолиса. Различия между показателями считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Для обозначения различий на гистограммах использовали следующие символы: * – от спиртового экстракта, □ – от вегетирующего растения, ○ – от цветущего растения, ■ – от листа в соответствующую фазу.

Так как антиоксидантная активность зависит от химического состава сырья, а фенольные соединения являются известными антиоксидантами, было проведено определение содержания их суммы и отдельных групп – флавоноидов и дубильных веществ. Поскольку вещества могут иметь различную химическую природу, использовали два экстрагента с различающейся полярностью – воду и 70 % этанол. Содержание фенолов зависит от фенологической фазы, поэтому растение исследовали в 3 фенологических состояниях.

При количественном определении суммы фенольных соединений и флавоноидов установлен факт лучшей экстракции данной группы метаболитов в воду по сравнению с 70 % этанолом. Экстракт из стеблей содержал меньшее количество исследуемых метаболитов, что может объясняться транспортной функцией, синтез и накопление значительного количества фенольных соединений в них не происходит.

При переходе к цветению и плодоношению увеличивается количество фенольных соединений (по сравнению с вегетирующим растением). В стеблевых экстрактах характерно увеличение содержания данной группы метаболитов в 6 раз для водного извлечения и в 3 раза для спиртового, изменения состава листовых экстрактов незначительны. Для флавоноидов характерна иная ситуация: их количество в листьях возрастает при переходе к цветению и плодоношению. На флавоноиды приходится порядка 10 – 20% от всех фенольных соединений.

Наибольшее содержание суммы фенольных соединений отмечено в водном экстракте из листьев, собранных в фазу плодоношения; флавоноидов – в водном экстракте листьев, собранных в фазу цветения.

Содержание фенольных соединений в экстрактах шалфея ярко-красного было выше, чем в экстракте листьев из фармакопейного шалфея лекарственного, который собирают в фазу цветения (*S. officinalis*, 21,6 мг галловой кислоты/г сухой массы), количество флавоноидов было меньше – у *S. officinalis* – 11,2 мг/г сухой массы, максимум *S. coccinea* – 6,6 мг/г сухой массы в водном экстракте из листьев, собранных в фазу цветения [9].

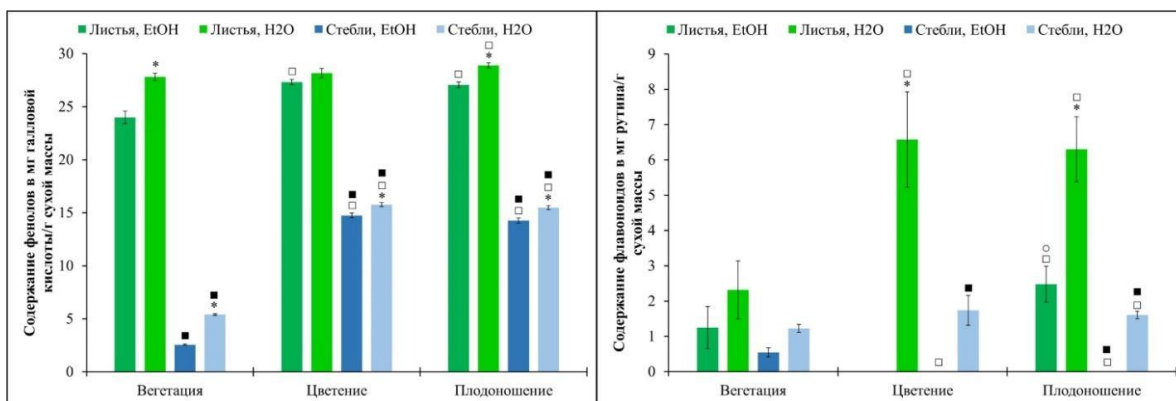


Рис. 1. Содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах *S. Coccinea*

Не показано влияние используемого экстрагента на содержание дубильных веществ. Стеблевые экстракты показали достоверно меньший результат по сравнению с листовыми. Содержание данной группы метаболитов было выше в цветущих и плодоносящих растениях по сравнению с вегетирующими для обоих органов. Большее количество дубильных веществ показано для этанольного экстракта из листьев, собранных в фазу плодоношения.

Для большинства исследуемых экстрактов показана высокая восстанавливающая активность. Большие значения для листьев показаны при использовании для экстракции 70 % этанола, для стеблей – вода. Наибольшей активностью обладал водный экстракт из стеблей, собранных в фазу цветения. В экстрактах из цветущих и плодоносящих растений восстанавливающая активность возрастает при переходе к цветению и плодоношению, причем в стеблях отличия являются более значительными, чем в листьях, что, вероятно, связано с интенсификацией транспорта биологически активных веществ по стеблю во время цветения и плодоношения.

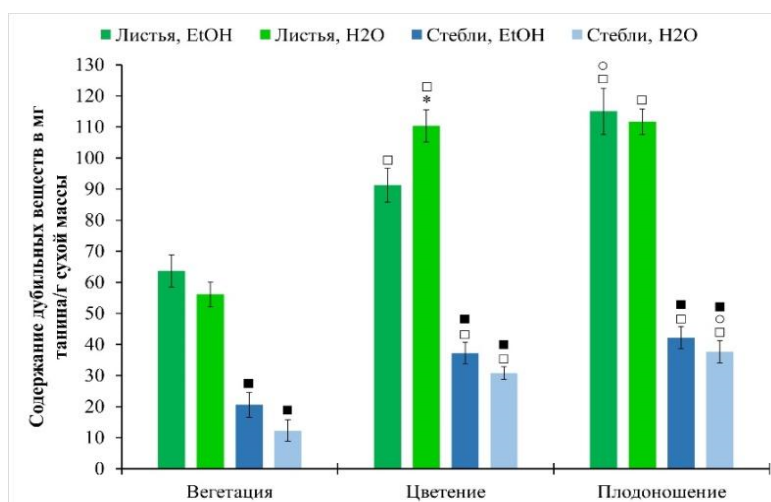


Рис. 2. Содержание дубильных веществ в экстрактах *S. Coccinea*

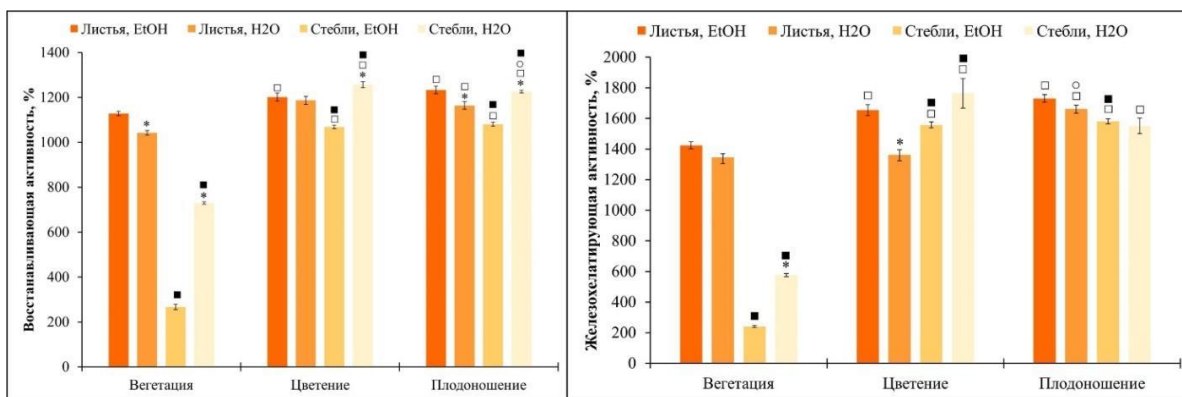


Рис. 3. Общий восстановительный потенциал и железохелатирующая активность экстрактов *S. Coccinea*

Железохелатирующая активность экстрактов не зависела от типа используемого экстрагента. Наибольшей активностью обладал водный экстракт из стеблей, собранных в фазу цветения. Экстракты из стеблей, собранных в фазу вегетации обладают меньшей активностью, по сравнению с листьями. Экстракты из стеблей, собранных в фазу цветения и плодоношения не значительно отличаются от соответствующих листовых экстрактов.

Есть различия в антиоксидантной активности в зависимости от фенофазы, в которую был собран шалфей ярко-красный – в фазу цветения и плодоношения экстракты обладали большей, чем в фазу вегетации, железохелатирующей активностью. В стеблях это можно было бы обосновать повышением содержания фенольных соединений на основании схожести профилей графиков, но при статистическом анализе не было обнаружено достоверных корреляций между общим содержанием фенольных соединений и железохелатирующей активностью ни для одного образца.

Водные экстракты достоверно лучше этанольных связывали ABTS⁺-радикал. Стеблевые экстракты демонстрировали схожую (в вегетирующем состоянии) или большую (при цветении и плодоношении) активность, чем листовые экстракты. Наибольшей активностью обладал экстракт из стеблей, собранных в фазу плодоношения.

В листьях, при переходе к цветению, наблюдается падение активности по сравнению с вегетирующим растением. Для стеблевых экстрактов такой зависимости не наблюдается – активность экстрактов из цветущих и плодоносящих растений повышается по сравнению с экстрактами из вегетирующих растений.

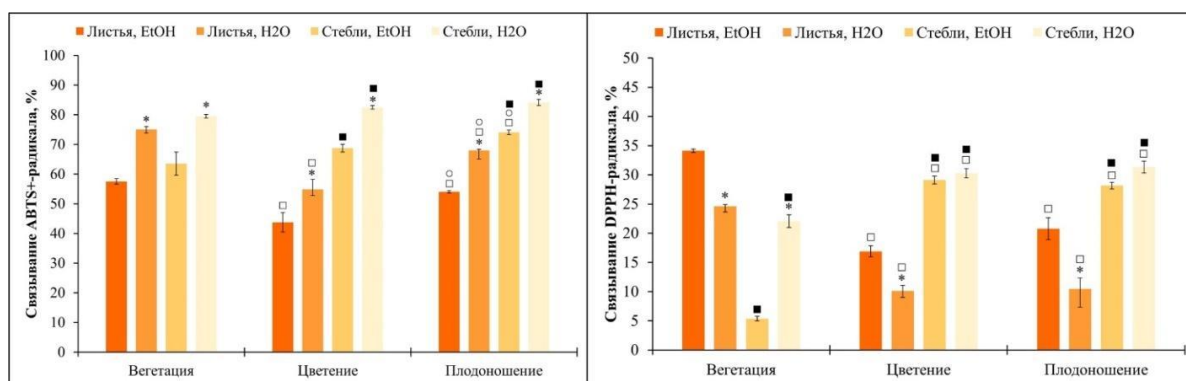


Рис. 4. ABTS⁺ и DPPH-связывающая активность экстрактов *S. Coccinea*

Большей активностью связывать DPPH-радикал обладают этанольные экстракты листьев, для экстрактов из стеблей, собранных в фазу цветения и плодоношения, нет различий в активности, при использовании разных экстрагентов. Наибольшей активностью обладал этанольный экстракт из листьев, собранных в фазу вегетации. При переходе к цветению и плодоношению довольно сильно менялось соотношение антирадикальной активности листовых экстрактов к стеблевым: для листового извлечения характерно уменьшение способности к связыванию DPPH[•], для стеблевого – ее увеличение. Это может быть связано с оттоком из листьев по стеблю каких-либо биологически активных веществ.

Экстракты показали высокую *in vitro* антиоксидантную и антирадикальную активность. На следующем этапе была проведена оценка их биологической активности. В тесте на антибактериальную активность показал эффект только этанольный экстракт из листьев, собранных в фазу цветения – вокруг лунки фиксировали стерильную зону ~1 мм, остальные экстракты не оказали действия на культуру *E. coli*.

При определении цитотоксической активности выявлено, что этанольный экстракт из листьев, собранных в фазу цветения, достоверно подавлял метаболическую активность раковых клеток линии HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) и повышал пролиферативную активность нормальных клеток линии Vero, относительно контрольного образца. Этанольный экстракт из листьев, собранных в фазу вегетации, подавлял развитие клеток двух линий.

Таблица 1

Цитотоксическая активность этанольных экстрактов листьев <i>S. coccinea</i>				
	Вегетация		Цветение	
	HepG2	Vero	HepG2	Vero
Пролиферативная активность, %	63,46 ± 2,08	71,28 ± 5,35	79,04 ± 4,20	114,22 ± 6,43

Выводы. *Salvia coccinea* богата фенольными соединениями, большую часть которых вероятно составляют фенольные кислоты, поскольку соотношение флавоноидов к общей сумме фенолов было мало и составляло от ~ 0,05 (для этанольного экстракта из листьев, собранных в период вегетации) до ~ 0,23 (для водного экстракта их листьев, собранных в период цветения). Лучшим источником БАВ являются листья, собранные в фазу цветения, лучшим экстрагентом – вода. По сравнению с шалфеем лекарственным *S. coccinea* содержит больше фенольных соединений, но уступает по количеству флавоноидов в два и более раза.

Показана достаточно большая антиоксидантная активность, которая при переходе растения к цветению и плодоношению, как правило, увеличивалась. В качестве источника антиоксидантов можно рассматривать не только экстракты листьев, но и водные экстракты из стеблей, собранных в фазу цветения.

Этанольный экстракт из листьев, собранных в фазу цветения, обладал бактерицидными свойствами, а также подавлял развитие раковых клеток линии HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) и стимулировал пролиферативную активность нормальных клеток линии Vero, что дает предпосылки для его возможного использования в медицине. Также перспективным является изучение цитотоксической активности отдельных компонентов экстракта.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Программы развития Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина в соответствии с программой стратегического академического лидерства "Приоритет-2030"

Библиографические ссылки

1. *Salvia* L. // WFO. 2024. URL: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000033888> (дата обращения: 06.05.2024)
2. Hamidpour M., Hamidpour R., Hamidpour S. Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer // *Journal of traditional and complementary medicine*. – 2014. – №4. – P. 82–88.
3. Lamien-Meda A. et al. Investigation of Antioxidant and Rosmarinic Acid Variation in the Sage Collection of the Genebank in Gatersleben // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2010. – №58. – P. 3813–3819.
4. Grzeszczuk M., Salachna P., Meller E. Changes in Photosynthetic Pigments, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of *Salvia coccinea* Buc'hoz Ex Etl. Induced by Exogenous Salicylic Acid and Soil Salinity // *Molecules*. – 2018. – №23 (6). – 11 P.
5. Мальцева Е. М. и другие. Антиоксидантная и антирадикальная активность in vitro экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития // *Медицина в Кузбассе*. – 2017. – Т. 16, №2. – С. 32–38.

6. Berker K. I. et al. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents // *Talanta*. – 2007. – №72 (3). – P. 1157–1165.
7. Valgas C et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2007. – №38 (2). – P. 369–380.
8. Ermoshin A. A et al. Phenolic Compounds and Biological Activity of Extracts of Calli and Native Licorice Plants // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2024. – Vol. 71:20. – 9 P.
9. Ghorbanpour M. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide // *Indian Journal of Plant Physiology*. – 2015. – №20 (3). – P. 249–256.

Воздействие свободных аминокислот на генерацию активных форм кислорода в условиях *in vitro* и *in vivo*

**Мацкевич В. С.^{А*}, Арзамазкина К. И.^А, Герман А. Д.^А,
Муравицкая А. О.^А, Чирская А. И.^А, Козел А. В.^А**

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: mackievic@bsu.by

Гидроксильный радикал (НО•) является наиболее реакционноспособной АФК и представляет наибольшую опасность для живых систем [1]. За счет высокого редокс-потенциала ($E_0 = +2,32$ В, рН 7) гидроксильный радикал может окислять практически любое химическое соединение, включая ДНК, белки и липиды [2], опосредуя большинство цитотоксических эффектов в аэробных организмах. Один из путей образования НО• в живых системах – это восстановление H_2O_2 , катализируемое ионами переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^+ и др.). В связи с этим, данная реакция часто используется для количественной оценки антиоксидантной способности растительных экстрактов и биологически активных веществ. Известно, что пул свободных аминокислот играет важную роль в росте и развитии растений, сигнальных явлениях, а также участвует в реакции растения на стресс [3]. Целью данной работы было оценить способность важнейших аминокислот влиять на продукцию НО• в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Анализ продукции гидроксильных радикалов осуществлялся методом спектрометрии электронного парамагнитного резонанса. В качестве спиновой ловушки добавляли ДМПО (5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид) в концентрации 100 ммоль/л. Сигнал ДМПО-НО• регистрировался при помощи ЭПР-спектрометра SpinscanX и анализировался в программе eSpinoza (ADANI). Эксперименты *in vivo* проводились с использованием модельных растений *Arabidopsis thaliana* природного

экотипа Col-0. Растения выращивались в стерильной вертикальной культуре в чашках Петри на полной среде Мурасиге и Скуга, pH 6,0, 1% сахара, 0,35% Phytigel в контролируемых условиях (22°C, 16 ч свет/ 8 ч темнота). Уровень АФК в клетках корня 7-дневных проростков арабидопсиса после 30 мин воздействия стресс растворов регистрировался при помощи флуоресцентного зонда дигидроэтидиум (ДГЭ; $\lambda_{ex} = 490$ нм, $\lambda_{em} = 540$ нм) на флуоресцентном микроскопе Nikon TS100. Изображения анализировались при помощи приложения ImageJ.

Результаты и их обсуждение. С использованием ЭПР-спектроскопии было показано, что смесь 1 ммоль/л CuCl_2 , 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2 , pH 6 (Cu/a) с добавлением 100 ммоль/л ДМПО генерирует характерный четырехпиковый сигнал аддуктов ДМПО-НО•. Интенсивность данного ЭПР-сигнала была в 70 раз выше по сравнению с контролем (буферный раствор: 0,1 ммоль/л KCl, 0,1 ммоль/л CaCl_2 , 1 ммоль/л ТРИС, 2 ммоль/л МЕС). Было продемонстрировано, что интенсивность ЭПР-сигнала ДМПО-НО• значительно снижалась в присутствии свободных аминокислот (1 ммоль/л гистидина, аланина, аспарагина и пролина). Сами аминокислоты не модифицировали сигнал ДМПО, т.е. не обладали редокс-активностью. В случае добавления гистидина Cu/a ЭПР-сигнал уменьшался приблизительно на 80%, аланина – на 95%, аспарагина – на 90%. Добавление пролина не воздействовало на ЭПР-сигнал, вызываемый аддуктами ДМПО-НО•. Результаты также были подтверждены с использованием эпифлуоресцентной микроскопии и зонда дигидроэтидиум в интактных корнях *Arabidopsis thaliana*, однако в данном случае эффекты были ниже. Таким образом, в работе было продемонстрировано, что свободные аминокислоты могут снижать ферментативную продукцию НО• в водных растворах и оказывать умеренное протекторное влияние на генерацию активных форм кислорода в интактных корнях растений при окислительном стрессе.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б24-060) и ГПНИ (№ ГР 20241163).

Библиографические ссылки

1. Halliwell H., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2015. – 905 p.
2. Sanna D, Fadda A. Role of the hydroxyl radical-generating system in the estimation of the antioxidant activity of plant extracts by electron paramagnetic resonance (EPR) // Molecules. 2022. Vol. 27(14). 4560.
3. Trovato M., Funck D., Forlani G. et al. Editorial: Amino Acids in Plants: Regulation and Functions in Development and Stress Defense // Front Plant Sci. 2021. Vol. 12. 772810.

Роль гистидина в индукции токсических и сигнальных реакций в корнях высших растений в ответ на Ni^{2+}

**Мацкевич В. С.^{A*}, Самохина В. В.^A, Муравицкая А. О.^A,
Гриусевич П. В.^A, Герман А. Д.^A, Арзамазкина К. И.^A,
Губаревич К. И.^A, Демидчик В. В.^A**

^A Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь;

*E-mail: mackievic@bsu.by

Никель (Ni^{2+}) – незаменимый элемент минерального питания растений, который необходим для нормального протекания физиологических процессов в очень небольших количествах. В высоких концентрациях данный тяжелый металл вреден для метаболизма и вызывает выраженное токсическое действие. В ответ на повышение уровня никеля многие растения синтезируют и экскретируют лиганды-хелаторы, такие как гистидин (Гис), связывающие Ni^{2+} . С одной стороны, это приводит к выведению Ni^{2+} из почвенного раствора, с другой – приводит к накоплению редокс-активных комплексов Ni-гистидин вблизи плазматической мембраны. В настоящей работе тестировалась гипотеза, согласно которой формирование комплексов Ni-гистидин вызывает активацию систем редокс- и Ca^{2+} -сигнализации, способствуя распознаванию избытка Ni^{2+} в среде. Целью настоящего исследования являлось установление роли взаимодействия Ni^{2+} и Гис в индукции токсических и сигнальных реакций в корне высших растений в условиях никелевого стресса. В опытах с регистрацией прорастания модельных растений *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. на среде с никелем было показано, что данный тяжелый металл ингибирует формирование и рост корневой системы начиная с концентрации 10 мкМ, в тестовой системе с заменой среды – с 30 мкМ, в гидропонике – с 3 мкМ. Добавление Гис, в соотношении 2 Гис / 1 Ni^{2+} , значительно понижало токсичность Ni^{2+} . При помощи ЭПР-спектроскопии и спиновой ловушки 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксидом (ДМПО) было показано, что 0,01-3 мМ Ni^{2+} не вызывает формирования гидроксильных радикалов в стандартных биологических условиях в присутствии 1 мМ L-аскорбата и 1 мМ H_2O_2 . В то же время, введение никеля на фоне Гис вызывало мощный синтез гидроксильных радикалов. Аналогичный эффект был продемонстрирован в тестах с флуоресцентным зондом дигидроэтидиум (ДГЭ). Даже концентрация 3 мМ Ni^{2+} (летальный уровень) не вызывала генерацию АФК в корне. При этом введение Ni^{2+} на фоне Гис активировало продукцию АФК, которая достигала максимума за 30 мин. Добавление антиоксидантов (диметилсульфоксида) снижало накопление АФК под действием Ni^{2+} -Гис₂. Люминометрический тест (Ca^{2+} /экворин) показал, что добавление 0,01- 3 мМ Ni^{2+} к корням арабидопсиса не вызывало изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$, однако его

введение на фоне Гис индуцировало значительный Ca^{2+} -сигнал. Таким образом, избыток никеля в присутствии Гис распознавался системой Ca^{2+} -сигнализации растительной клетки. С использованием комплекса молекулярных и физиологических подходов выявлены гены-мишени Ni^{2+} -Гис₂ в клетке, такие как редокс-чувствительный K^{+} -канал GORK, глутатион-редуктаза GR1, Ca^{2+} -зависимая протеинкиназа СРК6 и др. Опыты с сельскохозяйственными видами продемонстрировали высокую чувствительность к никелю корневой системы пшеницы и подсолнечника и низкую чувствительность гороха (данный вид рос до 10 мМ Ni^{2+} в среде). Вероятно, это связано с высокой важностью уреазы (никель-содержащий фермент) для бобовых растений.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б24-060) и ГПНИ (№ ГР 20241163).

Как растение приспосабливается к гравитационным воздействиям: адаптация и стресс

Медведев С. С.^{А*}

^А Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербург, Россия. *E-mail: s.medvedev@spbu.ru

Основой, благодаря которой живые организмы ориентируются в пространстве, является *полярность*. Именно полярность является тем инструментом, с помощью которого осуществляется разметка формирующихся органов и тканей растения, создается специфическая трехмерная структура организма, обеспечивается его целостность [1-3]. В свою очередь, компасом для осевой или аксиальной организации организма в пространстве является *вектор силы тяжести*. Сила тяжести оказывает определяющее влияние на формирование трехмерной структуры любых живых организмов. Изменение положения растения или его отдельных частей в пространстве относительно вектора силы тяжести оказывает *гравитационные воздействия*. Растения, эволюция которых произошла на Земле, хорошо приспособлены к ее силе тяжести и способны быстро адаптироваться, в случае если происходит изменение их положения. Такого рода адаптации, как правило, не приводят к развитию стресса и находятся в рамках *природной пластичности растений*.

В последние годы, в связи с активным освоением космоса, начала быстро развиваться такая наука как космическая (гравитационная) биология. В обществе появился запрос на исследование поведения живых организмов в условиях микрогравитации или измененной силы тяжести.

Накапливается все больше информации о механизмах приспособления к таким непривычным для растений условиям [4]. Возникает вопрос, являются ли такие гравитационные воздействия стрессовыми? Существует ли у растений *гравитационный стресс*?

По мере того, как продолжительность пребывания живых организмов в космосе увеличивается, становится очевидным, что невесомость значительно влияет на многие функции. Выявлен ряд серьезных изменений, которые происходят с космонавтами при длительном пребывании в космосе: потеря костной массы, мышечная атрофия, ортостатическая непереносимость, нарушение деятельности сердечно-сосудистой системы [5]. Важным механизмом при этом является развитие прооксидативных состояний, включая повышенную экспрессию окислительных ферментов (например, НАДФ⁺-оксидазы) и снижение экспрессии антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза) [6]. Механизмом генерации АФК в условиях микрогравитации, по-видимому, является усиление активности окислительных ферментов и снижение активности антиоксидантов. Например, моделируемая микрогравитация вызывала снижение антиоксидантных ферментов СОД, GPx и CAT и увеличение количества АФК в нейрональных клетках крыс [7]. Выявлено увеличение уровня АФК и снижение уровня глутатиона в ответ на моделируемую микрогравитацию в стволе и лобной коре мозга мышей [8].

В нашей научной группе было сконструировано устройство для случайного позиционирования растений, которое рандомизирует их положение относительно вектора силы тяжести путем постоянного вращения в 3-х взаимно перпендикулярных осях со случайно изменяющейся скоростью и направлением. Благодаря этому, мы получили возможность имитировать условия микрогравитации и изучать реакцию растений. Модельным объектом являлись растения *Arabidopsis thaliana* L. и *Brassica napus* L. [9-13]. Дезориентация положения растений относительно вектора силы тяжести инициировала хаотичный рост проростков. Установлен эффект накопления уровня пероксида водорода, суммарного аскорбата и окисленной формы глутатиона [14-16]. В надземной части проростков снижалось содержание метаболитов энергетического обмена, одновременно возрастал уровень вторичных метаболитов. В корнях резко возрастало содержание рибосомальных белков, Са-зависимых протеинкиназ и ферментов синтеза целлюлозы. Снижался уровень белков, связанных с формированием цитоскелета и фоторецепторов. Повышалось содержание белков Са-сигналинга, снижалось содержание кинезинов и ряда структурных рибосомальных белков. Клиностатирирование активировало экспрессию гена *SGR7*, который отвечает за регуляцию гравитропизма, а также

гена *CAM4*, кодирующего кальмодулин. Установлено также, что активировалась экспрессия генов *ADF1*, кодирующих белки, которые регулируют деполимеризацию F-актина. Наибольший эффект клиностатирования оказало на экспрессию гена *SOK4*, кодирующего белок SOSEKI4, что по-японски означает «cornerstone» (краеугольный камень). Белки SOSEKI обладают уникальной способностью к локализации в конкретных точках плазматической мембраны и в настоящее время рассматриваются как интеграторы позиционных сигналов, поступающих от инструментов полярности растительных клеток [17-18].

Таким образом, несомненно, что рандомизация положения растений относительно вектора силы тяжести вызывает глубокие метаболические изменения, которые связаны с *гравитационным стрессом*. Согласно нашей гипотезе, прежде всего, происходит нарушение *транспортной логистики клеток*: процессов везикулярного транспорта PIN-белков, ионных каналов и переносчиков ионов Ca^{2+} , ROP-белков, элементов клеточной стенки. Далее модифицируются элементы цитоскелета и сети полимеров клеточной стенки, нарушается кальциевый сигналинг и полярный транспорт ауксина. В результате нарушается нормальное функционирование *клеточных инструментов полярности*, приводящее к хаотичности процессов роста и морфогенеза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20–16–00086–П.

Библиографические ссылки

1. Медведев С.С. Полярность и ее роль в регуляции роста и морфогенеза растений (Тимирязевские чтения, 73). СПб: Наука, 2013. 77 с.
2. Медведев С.С. Физиологические основы полярности растений. СПб: Кольна, 1996. 159 с.
3. Medvedev S.S. Mechanisms and physiological role of polarity in plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. 59: 502–514.
4. Chin S., Blancaflor E.B. Plant gravitropism: From mechanistic insights into plant function on earth to plants colonizing other worlds. In *Methods Mol Biol.*, 2022. P. 1–41.
5. Takahashi K., Okumura H., Guo R., Naruse K. Effect of oxidative stress on cardiovascular system in response to gravity. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18: 1426.
6. Nguyen H.P., Tran P.H., Kim K.-S., Yang S.-G. The effects of real and simulated microgravity on cellular mitochondrial function. *Microgravity*. 2021. 7: 44.
7. Wang, J., Zhang, J., Bai, S., Wang, G., Mu, L., Sun, B., Wang, D., Kong, Q., Liu, Y., Yao, X., et al. Simulated microgravity promotes cellular senescence via oxidant stress in rat PC12 cells. *Neurochem. Int.* 2009. 55: 710–716.
8. Wise K.C., Manna S.K., Yamauchi K., Ramesh V., Wilson B.L., Thomas R.L., Sarkar S., Kulkarni A.D., Pellis N.R., Ramesh G.T. Activation of nuclear transcription factor-KB in mouse brain induced by a simulated microgravity environment. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 2005. 41: 118.

9. Pozhvanov G., Sharova E., Medvedev S. Microgravity modelling by two-axial clinorotation leads to scattered organization of cytoskeleton in *Arabidopsis* seedlings. *Funct. Plant Biol.* 2021. 48: 1062.
10. Pozhvanov G.A., Gobova A.E., Bankin M.P., Vissenberg K., Medvedev S.S. Ethylene is involved in the actin cytoskeleton rearrangement during the root gravitropic response of *Arabidopsis thaliana*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. 63: 587–596.
11. Pozhvanov G.A., Klimenko N.S., Bilova T.E., Shavarda A.L., Medvedev S.S. Ethylene-dependent adjustment of metabolite profiles in *Arabidopsis thaliana* seedlings during gravitropic response. *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. 64: 906–918.
12. Frolov A., Didio A., Ihling C., Chantzeva V., Grishina T., Hoehenwarter W., Sinz A., Smolikova G., Bilova T., Medvedev S. The effect of simulated microgravity on the *Brassica napus* seedling proteome. *Funct. Plant Biol.* 2018. 45: 440.
13. Chantseva V., Bilova T., Smolikov, G., Frolov A., Medvedev S. 3D-clinorotation induces specific alterations in metabolite profiles of germinating *Brassica napus* L. seeds. *Biol. Commun.* 2019. 64: 55–74.
14. Sharova E.I., Medvedev S.S. Redox reactions in apoplast of growing cells. *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. 64: 1–14.
15. Sharova E.I., Medvedev S.S., Demidchik V.V. Ascorbate in the apoplast: Metabolism and functions. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. 67: 207–220.
16. Sharova E.I., Smolikova G.N., Medvedev S.S. Determining hydrogen peroxide content in plant tissue extracts. *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. 70: 16–18.
17. Yoshida S., van der Schuren A., van Dop M., van Galen L., Saiga S., Adibi M., Möller B., ten Hov, C.A., Marhavy P., Smith R. et al. A SOSEKI-based coordinate system interprets global polarity cues in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 2019. 5: 160–166.
18. van Dop M., Fiedler M., Mutte S., de Keijzer J., Olijslager L., Albrecht C., Liao C.-Y., Janson M.E., Bienz M., Weijers D. DIX domain polymerization drives assembly of plant cell polarity complexes. *Cell*. 2020. 180: 427–439.

Метаболические “рыцари” древних лишайников:

анти- и прооксиданты

Минибаяева Ф. В.^{A*}, Beckett R. P.^B

^A Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия.

*E-mail: fminibayeva@gmail.com

^B School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Scottsville, South Africa

Лишайники – симбиотические ассоциации, состоящие, в основном, из грибов аскомицетов (микобионт) и водорослей и/или цианобактерий (фотобионты). В действительности лишайники представляют собой миниатюрные экосистемы, поскольку, наряду с основными симбионтами, таллом лишайника содержит также весьма специфичную бактериальную микробиоту и паразитирующие лишайниковые грибы. Несмотря на то, что

эти древние ассоциации возникли около 450 миллионов лет назад, они являются нашими современниками. Одной из причин такого эволюционного долголетия является их уникальная устойчивость к действию неблагоприятных факторов и способность выживать в чрезвычайно суровых условиях окружающей среды, таких как засуха, низкие температуры, длительная темнота, избыточная радиация. Среди биохимических механизмов естественной селекции лишайников особое внимание привлекает синтез и накопление в талломе защитных метаболитов. Лишайники производят множество алифатических и ароматических соединений, которые синтезируются в результате первичного или вторичного метаболизма. Первичные метаболиты – это внутриклеточные молекулы, которые необходимы для выполнения основных функций жизни и относятся к различным химическим классам, включая аминокислоты, пептиды, белки, полиолы, моно-, олиго- и полисахариды, липиды, каротиноиды и витамины. Многие из этих первичных метаболитов не являются специфичными только для лишайников и могут быть легко обнаружены в свободноживущих грибах, водорослях, а также в высших растениях. В симбиозе лишайников оба партнера – микобионт и фотобионт – несут ответственность за производство этих первичных метаболитов. В отличие от этого, вторичные метаболиты синтезируются, в основном, лишенизированными грибами. Лишайники синтезируют огромное количество вторичных метаболитов, в том числе, так называемых «лишайниковых веществ». В настоящее время в лишайниках идентифицировано более 1 050 различных вторичных метаболитов, из них около 700 уникальны для лишайников. В лишайниках известны три основных пути биосинтеза вторичных метаболитов: ацетил-малонатный, шикиматный и мевалонатный путь. Вторичные метаболиты по биосинтетическому происхождению и химической структуре классифицируются по таким классам соединений, как дибензофураны, депсиды и депсидоны, нафтохиноны, антрахиноны, ксантоны и другие. Количество вторичных метаболитов варьирует обычно от 0,1 до 10%, а иногда достигает 30% от сухого веса таллома. Эти соединения широко используются в хемотаксономии и систематике лишайников. Кроме того, благодаря своим физико-химическим характеристикам, вторичные метаболиты обеспечивают фиксацию лишайников на определенных субстратах, в том числе чрезвычайно обедненных органическими веществами, таких как камни, скалы, лава. Наличие лишайниковых веществ позволяет лишайникам произрастать в разнообразных, зачастую стрессовых, экологических нишах. Лишайниковые вещества вовлечены в селективный выбор симбионтов, аллелопатию, они регулируют фотосинтез, дыхание, проявляют защитные свойства, в том числе защиту талломов от световой радиации, патогенных

бактерий и грибов. Эти соединения важны также для круговорота металлов и защиты таллома лишайников от химического загрязнения. Одними из интенсивно изучаемых свойств метаболитов лишайников являются их антиоксидантные свойства. Биосинтез разнообразных вторичных метаболитов – это компромисс, которым лишайники оплачивают защиту важных метаболических процессов, таких как фотосинтез и дыхание.

Изучение вторичных метаболитов лишайников затруднено из-за особенностей, присущих биологии лишайников. Чрезвычайно медленный рост лишайников (от 0,5 до 8 мм в год), тесное взаимодействие между симбионтами, сложности реконструкции симбиоза в лабораторных условиях и химическая сложность вторичных метаболитов затрудняют раскрытие генетических путей, участвующих в биосинтезе этих соединений. Задачи по расшифровке тонких механизмов биосинтеза вовлекают метагеномное секвенирование, культивирование *in vitro* и метаболомный анализ.

Как правило, лишайники устойчивы к световому стрессу, в том числе благодаря наличию фотозащитных вторичных метаболитов. Так, темно-коричневый пигмент меланин играет значительную роль в защите лишайников от УФ-Б стресса, однако ключевые драйверы меланизации остаются неизученными. Меланины – гидрофобные гетерогенные полимеры, образованные последовательными реакциями окисления фенольных/индольных предшественников и последующей полимеризации промежуточных фенолов и хинонов. Мы обнаружили, что УФ-Б индуцирует меланизацию таллома *Lobaria pulmonaria* и некоторых других лишайников и показали, что меланин обеспечивает защиту фотобионта от фотоингибирования, вызванного высокой освещенностью (Beckett et al., 2019). Транскриптомное профилирование лишайника *L. pulmonaria* продемонстрировало дифференциальную экспрессию генов синтеза нескольких типов меланина и других вторичных метаболитов. Воздействие УФ-Б вызывало значительное потемнение верхнего кортекса таллома, что коррелировало с повышенной экспрессией биосинтетических генных кластеров, участвующих в синтезе эу- и алломеланинов, а также предшественников меланинов (Leksin et al., 2024). Профили экспрессии общих стресс-ассоциированных генов, в частности, связанных с детоксикацией активных форм кислорода (АФК), защитой белков и восстановлением ДНК, указывают на то, что микобионт является более чувствительным к УФ-Б облучению и восприимчивым партнером в симбиозе лишайников.

С помощью комплекса биохимических и биофизических методов было продемонстрировано, что меланины лишайников обладают антиоксидантными, хелатирующими и парамагнитными свойствами. Выраженная антиоксидантная активность эумеланина, экстрагированного из *L. pulmonaria*, была подтверждена реакциями по тушению радикала DPPH и

эффективной способностью к хелатированию Fe^{2+} . Анализ парамагнитных характеристик меланинов лишайников продемонстрировал, что ЭПР спектр меланина из *L. pulmonaria* имеет типичную картину асимметричного синглета с концентрацией парамагнитных комплексов $0,64 \times 10^{17}$ спин g^{-1} (Minibayeva et al., 2024). Похожими антиоксидантными и парамагнитными характеристиками обладают и алломеланины, экстрагированные из лишайников *Cetraria islandica* и *Pseudevernia furfuracea* (Rassabina et al., 2020).

Кроме того, нами была обнаружена способность меланина, выделенного из лишайника *L. pulmonaria*, противостоять окислительному стрессу и связанным с ним повреждениям в модельных животных тканях – диафрагме мышцы, основной дыхательной мышце. Предварительная обработка мышц меланином заметно снижала УФ-индуцированное увеличение внутриклеточных и внеклеточных АФК, а также опосредованное митохондриальным ингибитором антимицином А увеличение продукции АФК в митохондриях, сопровождающееся перекисным окислением липидов и потерей асимметрии мембран. Кроме того, меланин ослаблял подавление нервно-мышечной передачи и изменения сократительных реакций, спровоцированные экзогенной H_2O_2 . Как известно, избыток АФК нарушает сокращение и нервно-мышечную передачу, вызывая дисфункцию скелетных мышц и утомляемость (Dogan et al., 2022). Окислительный стресс является одним из основных причинных факторов патологических изменений мышц при различных заболеваниях. Таким образом, полученные нами результаты проливают свет на перспективы применения меланина лишайника в качестве защитного компонента для лечения заболеваний скелетных мышц, которые сопровождаются повышенным производством АФК.

Известно, что меланины – универсальные темные пигменты и встречаются во многих организмах, в том числе и животных. Эндогенный меланин присутствует в коже, волосах, глазах, ушах и нервной системе млекопитающих, где он выполняет функции антиоксиданта, противовоспалительного вещества, светового сенсора и поглотителя токсичных соединений (Korytowski et al., 1995). Следует отметить, однако, что меланины также могут проявлять прооксидантные свойства и опосредовать фототоксичность. При УФ-облучении синтетические эумеланины и феомеланины, а также некоторые природные меланины могут генерировать АФК, включая H_2O_2 , супероксидный анион-радикал и даже синглетный кислород (Mokrzynski et al., 2023). Кроме того, фотореактивность меланина значительно возрастает по мере фотодеградации пигмента и образования интермедиатов радикальной природы, что приводит к снижению антиоксидантной способности меланина.

Еще одним пигментом, поглощающим УФ, является оранжевый пигмент париедин антрахиноновой природы. Париедин является доминирующим кортикальным пигментом лишайников *Caloplaca* и *Xanthoria* из семейства *Teloschistaceae*, он также синтезируется в органах покрытосеменных растений, например, в корнях *Rumex crispus*. Известно, что париедин из *X. parietina* обладает антиоксидантными свойствами, однако его основная защитная роль – это защита таллома от высокой фотосинтетически активной радиации и УФ излучения. Существуют данные о роли париедина в защите *X. parietina* от кадмиевой токсичности благодаря снижению Cd-индуцированного окислительного стресса. Интересно, что удаление париедина щадящим способом не влияет на интенсивность фотосинтеза, однако приводит к снижению стабильности мембран микобионта при обезвоживании, вероятно, вследствие повышения уровня перекисного окисления липидов. Биоинформатический анализ показал, что гены, вовлеченные в биосинтез париедина, организованы в биосинтетические генные кластеры. Обезвоживание приводит к повышению уровня экспрессии генов биосинтеза париедина, а также генов, кодирующих осмопротекторные, осмопротекторные и антиоксидантные белки. Анализ талломов *X. parietina* методами биохимии, биофизики и микроскопии свидетельствует о том, наличие париедина вносит вклад в защиту талломов лишайника от абиотических стрессов благодаря поддержанию стабильности мембран, обеспечению антиоксидантной защиты и формированию структурного барьера в кортексе талломов лишайника.

Различные вторичные метаболиты защищают лишайники от света разной длины волны и проявляют синергетические свойства в качестве антиоксидантов для защиты таллома лишайника и фотосистем фотобионта. Это было продемонстрировано для вульпиновой, пинастровой и усниновой кислот в лишайниках *Vulpicida pinastri* и *Letharia vulpina*. Интересно, в системе животных клеток усниновая кислота может проявлять как анти-, так и прооксидантное действие. Так, в высокой концентрации усниновая кислота, выделенная из лишайника *Xanthoparmelia farinosa*, вызывала повреждающий эффект на клеточные мембраны и снижала метаболизм в клеточной линии лимфоцитов человека при действии УФ-облучения. Однако в низких концентрациях и при физиологической интенсивности УФ-излучения усниновая кислота проявляла антиоксидантные свойства (Kohlhardt-Floehr et al., 2010).

Еще одним редокс-активным метаболитом лишайников является атранорин. Молекулярная структура этого депсида представляет собой ароматические кольца, связанные эфирной группой. Атранорин действует как антиоксидант, снижая уровень супероксида и перекисного окисления

липидов, однако в зависимости от концентрации он может проявлять токсичность, усиливая образование H_2O_2 и NO .

Таким образом, уникальные свойства метаболитов лишайников, в том числе разнообразие их редокс-свойств, делают эти естественные полимеры перспективными объектами для фундаментальных и прикладных исследований, в частности, для развития так называемой «зеленой электроники», применения в медицине, биотехнологии и ремедиации.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН и поддержана грантом РФФИ № 23-14-00327.

Библиографические ссылки

1. Beckett R.P., Solhaug K.A., Gauslaa Y., Minibayeva F. (2019) Improved photoprotection in melanized lichens is a result of fungal solar radiation screening rather than photobiont acclimation. *The Lichenologist*, 51(5): 483-491.
2. Leksin I., Shelyakin M., Zakhozhiy I., Kozlova O., Beckett R., Minibayeva F. (2024) Ultraviolet-induced melanisation in lichens: physiological traits and transcriptome profile. *Physiologia Plantarum* (submitted).
3. Minibayeva F.V., Rassabina A.E., Zakirjanova G.F., Fedorov N.S., Khabibrakhmanova V.R., Galeeva E.I., Kuznetsova E.A., Malomouzh A.I., Petrov A.M. (2024) Protective properties of melanin from lichen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. in models of oxidative stress in skeletal muscle. *Fitoterapia* (in press).
4. Rassabina, A.E., Gurjanov, O.P., Beckett, R.P., Minibayeva, F.V. (2020) Melanin from the lichens *Cetraria islandica* and *Pseudevernia furfuracea*: structural features and physicochemical properties. *Biochemistry (Moscow)*, 85: 623-628.
5. Dogan S.A., Giacchin G., Zito E., Viscomi C. (2022) Redox signaling and stress in inherited myopathies. *Antioxid. Redox Signal*, 37(4-6): 301-323.
6. Korytowski W., Sarna T., Zarba M. (1995) Antioxidant action of neuromelanin: the mechanism of inhibitory effect on lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319(1): 142-148.
7. Mokrzynski K., Sarna M., Sarna T. (2023) Photoreactivity and phototoxicity of experimentally photodegraded hair melanosomes from individuals of different skin phototypes. *J. Photochem. Photobiol. B*, 243: 112704.
8. Kohlhardt-Floehr C., Boehm F., Troppens S., Lademann J., Truscott T.G. (2010) Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation-studies on human cells. *J. Photochem. Photobiol. B*, 101(1): 97-102.

Анализ структурно-функциональных особенностей и экспрессионной активности *PR-9* генов проростков *Pinus sylvestris* в условиях инфицирования *Fusarium sp.*

Можаровская Л. В.^{А*}

^А Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь.

*E-mail: milamozh@yandex.ru

Основными компонентами системной приобретенной устойчивости растений являются PR-белки (с англ. pathogenesis-related proteins), которые входят в состав сигнальных систем растений, индуцируются в ответ на абиотический и биотический стресс, в том числе на инокуляцию фитопатогенных микроорганизмов. Среди генов, кодирующих PR-белки, относительно их структурно-функциональной организации в литературе выделяют до 19 семейств (от PR-1 до PR-19). К семейству PR-9 относятся растительные секреторные пероксидазы III класса.

Целью настоящего исследования являлось идентифицировать и изучить структурно-функциональные особенности, а также экспрессионную активность транскриптов генов *PR-9* проростков *Pinus sylvestris* в условиях биотического стресса – инфицирования *Fusarium sp.*

В лабораторных условиях проводился посев и выращивание семян *P. sylvestris* с последующим заражением культурой *Fusarium sp.* Создание повышенного инфекционного фона достигалось поэтапным внесением инокулюма гриба в субстрат перед посадкой семян, на 7 и 14 день после появления всходов. В качестве инокулюма использовали изолят *Fusarium sp.* (NCBI GenBank ID: MW429282.1), идентифицированного и выделенного из сеянцев *P. sylvestris* с признаками инфекционного полегания (лесной питомник Брестского лесхоза). Препараты кДНК получали из тканей корня и гипокотилия индивидуальных растений: проростков с симптомами инфекционного полегания и контрольного варианта, объединенных в пул ($n = 15$ для каждой группы растений). Высокопроизводительное секвенирование (NGS) кДНК выполнялось на основе секвенирующей платформы Ion PGM System. Обработку транскриптомных данных выполняли с помощью программных пакетов Ion Torrent Suite v. 5.0.4., UGENE v. 1.29.0 и др. Идентификация последовательностей проводилась с использованием онлайн-сервиса BLAST в NCBI GenBank. Количественную оценку транскриптомов проводили с применением RPM метрики. Сравнительный анализ, а также изучение особенностей структурно-функциональной организации идентифицированных транскриптов проводились на основе специализированных онлайн сервисов: NCBI CD-Search, NCBI ORFfinder, SWISS-MODEL, Phyre2.

По результатам анализа данных секвенирования и аннотации транскриптомов проростков *P. sylvestris* идентифицирована группа EST-маркеров *pr-9*, детерминирующих секреторную пероксидазу растительного типа (функциональный домен cd00693: secretory_peroxidase). Данный тип пероксидаз относится к III классу надсемейства гем-зависимых пероксидаз растений. Пероксидазы III класса, как правило, локализованы во внеклеточном пространстве или вакуолях растений, где выполняют множество тканеспецифичных функций: участвуют в детоксикации пероксида водорода (например, в хлоропластах и цитозоле), биосинтезе компонентов клеточной стенки (в частности, в процессах полимеризации монолигнолов), анаболизме этилена и катаболизме ауксина, а также в ответных реакциях на стресс [1].

При сравнительном анализе транскриптомов, в условиях заражения *Fusarium sp.* отмечено повышение экспрессионной активности транскриптов *pr-9* генов (RPM = 4778,94 – контрольный вариант; RPM = 6098,56 – условия инфицирования). В то же время, детальный анализ нуклеотидных последовательностей наиболее представленного транскрипта, в контрольной и исследуемой выборках, показал их различное происхождение, т.е. неортологичный характер. Для транскриптома проростков *P. sylvestris* варианта контроля идентифицировано 123 транскрипта, относящихся к генам *PR-9* семейства, из них наиболее представленный транскрипт №4468 (6% от общего числа коротких прочтений) при сравнительном изучении в базе данных NCBI по нуклеотидной последовательности показал наибольшее сходство ($\approx 90\%$) с учетной записью FJ050756.2 (*Pinus taeda*). Среди аминокислотных последовательностей наибольший уровень сходства в 79,6% наблюдался с секреторной пероксидазой III класса *Ginkgo biloba* (NCBI GenBank ID: AFR44628.1), кодируемой геном *Prx09* (NCBI GenBank ID: JX399851.1), а также с аминокислотной последовательностью пероксидазы *Picea abies* (NCBI GenBank ID: CAL25300.1). Для пространственной модели транслируемого функционального домена транскрипта №4468 отмечено наличие трех субдоменов: N-концевого дистального Ca^{2+} -связывающего, C-концевого проксимального Ca^{2+} -связывающего и В-субдомена.

Для транскриптома, в условиях инфицирования *Fusarium sp.*, было идентифицировано 27 транскриптов, содержащих в транслируемой последовательности функциональный домен cd00693, идентифицированных как представителей *PR-9* семейства. Сравнительное изучение в базе данных NCBI наиболее представленного среди *PR-9* транскрипта №769 (долевое участие – 22%, NCBI GenBank ID: MZ222279) показало наибольший уровень идентичности (88%) с депозитом BT122797.1, представляющим собой неаннотированную мРНК *Picea sitchensis*. Среди аннотированных

депозитов, наибольший уровень подобия (85% по транслируемой последовательности) был отмечен с пероксидазой *Picea abies* (NCBI GenBank ID: CAD92858.1). В отличие от вышепредставленного транскрипта №4468 контрольного варианта структура полипептида транскрипта №769 включает в своем составе следующие три субдомена: на N-конце дистальный Na^+ -связывающий, на C-конце проксимальный Ca^{2+} -связывающий и В-субдомен.

Присутствие Na^+ -связывающего субдомена вместо типичного Ca^{2+} согласуется с другими исследованиями пространственных структур растительных пероксидаз III класса [2, 3]. Присутствие сайтов связывания Ca^{2+} или Na^+ у пептидов обоих транскриптов, предположительно, указывает на ионный тип регуляции каталитической активности фермента [2]. Кроме того, согласно предсказанной модели, данный полипептид в качестве субстрата может использовать индол-3-уксусную кислоту (ИУК) – основной гормон растений класса ауксинов, участвующий в регуляции различных процессов роста и развития. Согласно гипотезе, выдвинутой S. F. Fu et al., данный растительный гормон может использоваться в качестве своеобразного «физиологического кода» взаимодействий фитопатогенных микроорганизмов и растений [4]. Таким образом, в ходе анализа транскриптомов проростков *P. sylvestris* в условиях инфекции *Fusarium* sp., в тканях растений диагностировано повышенное содержание мРНК пероксидаз с сайтами связывания ИУК. Исходя из того, что ИУК может выступать в качестве элиситора, стимулирующего индуцированную устойчивость растений, полученные данные указывают на участие ИУК-пероксидазного сигнального пути в рассматриваемой патосистеме.

Библиографические ссылки

1. Campa, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function / A. Campa // Peroxidases in chemistry and biology. – 1991. – Vol. 2. – P. 25–50.
2. Structural and spectroscopic characterisation of a heme peroxidase from sorghum / C. I. Nnamchi [et al.] // JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2016. – Vol. 21. – P. 63–70.
3. Crystal structure analysis of cationic peroxidase from proso millet and identification of its phosphatase active sites / X. Cui [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2021. – Vol. 69. – №. 22. – P. 6251–6259.
4. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms / S. F. Fu [et al.] // Plant signaling & behavior. – 2015. – Vol. 10, № 8. – P. e1048052.

Оценка влияния депривации элементов минерального питания на продукцию биоводорода и особенности фенотипа микроводорослей семейства *Chlorellaceae*

**Муравицкая А. О.^А, Светлаков В. И.^А, Вечерек М. С.^А,
Калейник М. Д.^А, Самович Т. В.^Б, Козел Н. В.^Б, Соколик А. И.^Б,
Габриелян Л. С.^В, Маноян Д. Г.^В, Демидчик В. В.^А**

^А Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

^Б Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

^В Ереванский государственный университет, г. Ереван, Армения

Получение биоводорода, представляющего собой перспективный источник энергии, является одной из актуальных задач биотехнологии. Наибольший интерес вызывает возможность получения водорода с использованием биосинтетического потенциала прокариотических или эукариотических фототрофных организмов, в том числе микроводорослей. Селекция высокопродуктивных штаммов микроводорослей семейства *Chlorellaceae*, способных осуществлять синтез H_2 для промышленных целей, является важным этапом для развития биоводородной энергетики. Потенциальным решением проблемы отбора продуцентов является применение подходов цифрового фенотипирования. Предполагается, что различия фенотипических характеристик могут коррелировать со способностью микроводорослей к биосинтезу H_2 . Целью данной работы являлись оценка продукции H_2 и цифровой анализ фенотипа водорослей семейства *Chlorellaceae* в связи с H_2 -генерирующей активностью штаммов белорусской и армянской коллекций. В качестве объектов исследования выступали штаммы микроводорослей *Chlorella kessleri* IBCE C-3, *Chlorella vulgaris* IBCE C-19 (Коллекция водорослей, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск) и *Parachlorella kessleri* PA-002 (Центр депонирования микроорганизмов НАН РА, Ереван). Культивирование осуществлялось на средах ТАР и Тамия (полноценных либо дефицитных по азоту и/или сере). Для индукции синтеза H_2 культуры на поздней логарифмической фазе роста помещались в анаэробные условия. Количество выделяемого H_2 в культурах определялось с помощью оценки окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) и газовой хроматографии. Для фенотипического анализа клеток микроводорослей была разработана компьютерная программа, позволяющая производить сегментацию цифровых изображений клеток, а также сверточная нейронная сеть для их классификации. Работа была проведена с использованием Python 3.9 и библиотек OpenCV, NumPy, Skimage, SciPy, Pandas и Tensorflow. Была создана нейронная сеть со сверточной архитектурой, содержащая 10 сверточных и 5 полносвязных слоев, тренировка происходила на наборе

данных размером в 10 000 фотографий, при этом 80 % изображений использовалось для тренировки, 20 % для валидации. Функция активации – ReLU, количество эпох – 100, размер батча – 32. Для тренировки применялась методика градиентного спуска, с оптимизатором Adam, в качестве метрик использовалась точность (*accuracy*). В качестве функции потерь выбиралась бинарная кроссэнтропия либо средний квадрат ошибок. Согласно полученным данным, наибольшей продуктивностью с точки зрения синтеза биоводорода характеризуется штамм *Parachlorella kessleri* PA-002. При этом лучшие показатели продемонстрировали культуры, находившиеся в условиях дефицита серы. Для них максимальная концентрация выделяемого водорода составила $42,1 \pm 6,4$ ммоль H_2 г сухой массы⁻¹ сут⁻¹. Метрика точности при идентификации исследуемых штаммов микроводорослей составила 96,38 %. Нейросетевой анализ позволил обнаружить различия между клетками культур микроводорослей *Parachlorella kessleri* PA-002, выращенных в разных условиях, с точностью 94,72 %. Для штаммов *Chlorella vulgaris* IBCE C-19 и *Chlorella kessleri* IBCE C-3 данные показатели составили 89,22 % и 90,46 % соответственно.

Работа выполнена в рамках проекта Б21АРМ-018, № госрегистрации 20213856 БРФФИ (Беларусь-Армения).

Оценка эффективности антиоксидантов природного происхождения при солевом стрессе в растениях пшеницы мягкой

**Нестерович М. А.^А, Подобед П. И.^А, Русакович А. А.^Б,
Черныш М. А.^{Б*}**

^А УО «Национальный детский технопарк», Минск, Беларусь.

^Б Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: chernyshmaryia@gmail.com

Растительные организмы постоянно подвергаются многочисленным стрессовым воздействиям, таким как почвенное засоление, засуха, недостаточная или избыточная влажность, высокие и низкие температуры, загрязнение почвы пестицидами и т.д. Одним из ключевых стресс-факторов является засоление почвы. Солевой стресс, как и многие другие стресс-факторы, приводит к генерации и накоплению свободных радикалов, определяющих окислительный стресс – процесс угнетения жизнедеятельности клеток под действием активных форм кислорода (АФК) [1; 2; 3]. В высоких концентрациях АФК подавляют естественную защиту клетки и приводят к окислительному повреждению ДНК, перекисному окислению липидов, модификациям белков, различным патологическим процессам,

негативно влияющим на жизнедеятельность организма и способны привести к его гибели [4; 5]. Все эти процессы неминуемо ведут к значительной потере урожая при культивировании важных сельскохозяйственных культур, в связи с чем поиск соединений, обладающих антиоксидантной и антирадикальной активностью, повышающих устойчивость растений к стрессу, в том числе к засолению, остается актуальной проблемой.

Целью данной работы являлось выявление и сравнение эффективности природных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, а также оценка их воздействия на морфометрические параметры пшеницы мягкой в условиях солевого стресса.

Оценка уровня АФК, в частности гидроксильного радикала проводилась методом ЭПР-спектроскопии с использованием спиновой ловушки DMPO [3-7]. Сигнал спинового аддукта DMPO-OH[•] в системе, генерирующей гидроксильный радикал, использовался в качестве контроля. В качестве антиоксидантов были протестированы 1 мМ аскорбиновая кислота, экстракты шиповника, розмарина, зелёного чая и винограда, соки черники и клубники. Была проведена оценка их способности снижать интенсивность ЭПР-сигнала в сравнении с контролем. Показано, что все протестированные вещества демонстрируют антиоксидантную активность, существенно снижая ЭПР-сигнал DMPO-НО[•], что, вероятно, связано с их способностью нейтрализовать гидроксильный радикал. Поскольку наибольшая эффективность была определена для аскорбата, экстрактов розмарина, шиповника и винограда, дальнейшие тесты проводились с использованием данных соединений.

С целью оценки протекторного эффекта природных и синтетических антиоксидантов на рост и развитие высших растений в условия солевого стресса проводились ростовые тесты на проростках *Triticum aestivum*. Пшеница выращивалась на среде Кнопа с добавлением различных концентраций хлорида натрия (50-150 мМ) и 2 % водных экстрактов винограда, шиповника и розмарина рулонным методом. Также было изучено влияние 0,5 мМ аскорбата. Результаты ростового теста на культуре *T. aestivum* представлены на рисунке.

При добавлении к среде культивирования 50 мМ хлорида натрия наблюдался гормезисный эффект. Средние значения длины корней пшеницы увеличились на 15 % по сравнению с контролем. Добавление более высоких концентраций NaCl приводило к значительному ингибированию роста пшеницы. Так, средние значения длины корней пшеницы на 10 сут выращивания в присутствии 100 мМ и 150 мМ хлорида натрия снизились на 33 % и 51 %, соответственно, по сравнению с контролем.

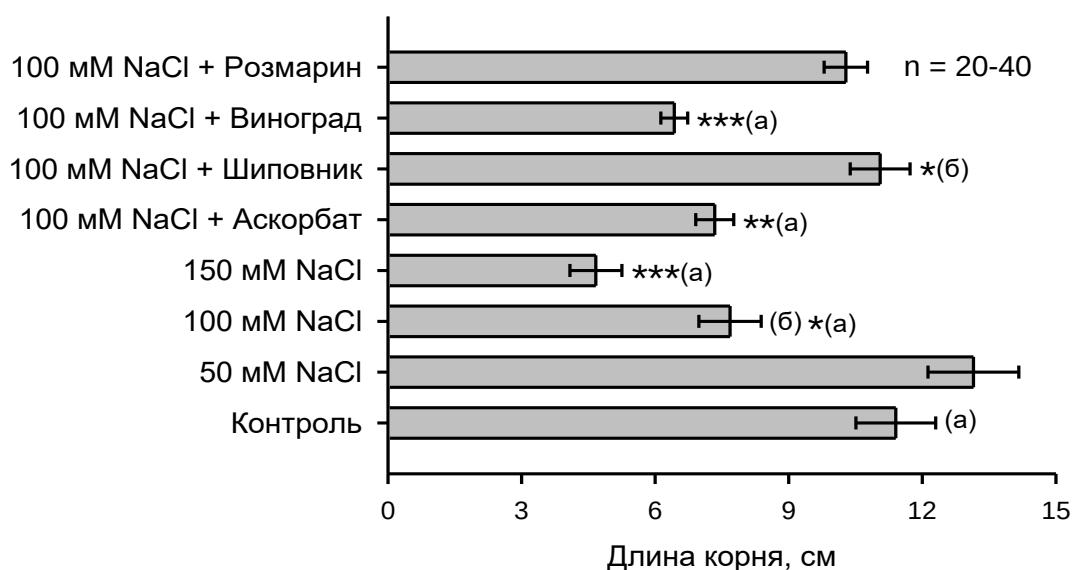


Рис. Средние значения длины корней *Triticum aestivum* на 10 сут культивирования. Достоверность различий рассчитывалась при помощи ANOVA теста: (а) – по отношению к контролю; (б) – по отношению к растениям, выращенным на среде с 100 мМ NaCl: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$; *** – $p < 0,0001$

Добавление к среде, содержащей 100 мМ NaCl, 0,5 мМ аскорбиновой кислоты, а также 2 % экстракта винограда не продемонстрировало стресс-протекторного эффекта, стимуляция ростовых процессов *T. aestivum* не наблюдалась. В тоже время добавление 2 % экстрактов шиповника и розмарина приводило к увеличению среднего значения длины корней на 44 % и 34 %, соответственно, относительно корней пшеницы, выращенной на среде с добавлением 100 мМ хлорида натрия. Длина корней пшеницы, культивируемой на средах с добавлением экстрактов шиповника и розмарина, была сопоставима с длиной корней растений контрольной группы без добавления стрессора.

Таким образом, в результате работы была выявлена способность водных экстрактов шиповника и розмарина оказывать протекторный эффект на проростки пшеницы в условиях солевого стресса, что может быть использовано для снижения стрессовой нагрузки на растения.

Библиографические ссылки

1. Demidchik, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology / V. Demidchik // Environmental and experimental botany. – 2015. – Vol. 109. – P. 212–228.
2. Окислительный стресс растений / Е.В. Хозеева, Ю.А. Зимина, Г.А. Срослова // Природные системы и ресурсы. – 2020. – Т. 10, № 4. – С. 31–36.
3. Reactive oxygen signaling and abiotic stress / G. Miller [et al.] // Physiologia Plantarum. – 2008. – Vol. 133. – P. 481–489.

4. Halliwell, H. Free radicals in biology and Medicine / H. Halliwell, J.M.C. Gutteridge – United Kingdom: Oxford University Press, 2015. – P. 40–290.
5. Salinity stress and nanoparticles: Insights into antioxidative enzymatic resistance, signaling, and defense mechanisms / A. Singh [et al.] // Environmental Research. – 2023. – Vol. 235.
6. Shukla, A.K. ESR spectroscopy for life science applications: An introduction / A. K. Shukla – Prayagraj, Uttar Pradesh, India: Springer International Publishing, 2021. – P. 72.
7. Swapnalini, Jh. Recent developments in electron paramagnetic resonance for spectroscopic applications / Jh. Swapnalini, S. Kumar, P. Banerjee // Biointerface Research in Applied Chemistry. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 301–312.

Система *UPBEAT1*-АФК-ПОД-*PAL* (*UPBEAT1*-ROS-POD-*PAL*) при изменении соотношения дифференцировка/пролиферация камбиальных инициалей у древесных растений на примере березы повислой *Betula pendula* var. *pendula* и карельской березы *B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti

**Никерова К. М.^{A*}, Галибина Н. А.^A, Софронова И. Н.^A,
Мощенская Ю. Л.^A, Корженевский М. А.^A, Тарелкина Т. В.^A,
Климова А. В.^A, Коржова М. А.^A, Макарова Т. Н.^A, Семенова Л. И.^A,
Серкова А. А.^A**

^A Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия.

*E-mail: knikerova@yandex.ru

Образование древесины, ксилогенез, происходит в результате деятельности латеральной меристемы – камбия (Fischer et al., 2019; Wang et al., 2021). Камбиальные производные, обращенные внутрь ствола, дифференцируются в структурные элементы ксилемы: сосуды, трахеиды, волокна, клетки осевой и радиальной паренхимы (Fromm, 2013). Этот процесс включает рост клеток растяжением, образование вторичной клеточной стенки, а для волокон, сосудов и трахеид – программируемую клеточную смерть (ПКС) (Turner et al., 2007). Выявление механизмов, регулирующих направление дифференцировки камбиальных производных, имеет как фундаментальное, так и практическое значение. У большинства растений процессы, связанные с дифференцировкой и пролиферацией апикальных меристем, а также цепь событий, приводящая в конечном итоге к ПКС, связаны с изменением баланса активных форм кислорода (АФК) (Van Breusegem, Dat, 2006; de Pinto et al., 2012), находящимся под контролем ферментов антиоксидантной системы (АОС) (Dumanović et al., 2021; Mittler, Zilinskas, 2004).

За последнее десятилетие появилась литература, посвященная исследованию *UPBEAT1 (UPB1)*, транскрипционного фактора, принадлежащего к семейству basic/helix-loop-helix (bHLH). Этот фактор играет решающую роль в регуляции распределения АФК и поддержании баланса между пролиферацией и дифференцировкой клеток в меристемах у травянистых растений. Было обнаружено, что он влияет на экспрессию пероксидаз (ПОД), которые являются одними из самых многофункциональных ферментов АОС. ПОД контролируют концентрацию АФК, таких как перекись водорода и супероксидный радикал. С другой стороны, многие процессы, ответственные за развитие апикальных меристем, контролируются балансом супероксидного радикала и перекиси водорода, когда они выступают в качестве сигнальных молекул (Tsukagoshi et al., 2010; Zeng et al., 2017). Ферменты АОС, перекись водорода, наряду с другими АФК, играют важную роль в процессе лигнификации клеточной стенки, который основан на полимеризации монолигнолов. Усиление этого процесса может свидетельствовать об изменении пути ксилогенеза. Кроме того, активность ферментов АОС, особенно апопластных ПОД, влияет на лигнификацию (Ogawa et al., 1996; Koutaniemi et al., 2007). Супероксиддисмутаза (СОД) запускает реакцию нейтрализации супероксидного радикала с образованием перекиси водорода, необходимой для реакции ПОД (Weydert, Cullen, 2009). Локализация образующейся перекиси водорода, возможно, в большей степени, чем его абсолютная концентрация, может быть ответственна за инициирование последующих реакций, направленных либо на нейтрализацию образующейся перекиси водорода посредством КАТ, либо ПОД (Winterbourn, 2018). Для поддержания деления клеток и правильного функционирования клеточных стенок решающее значение имеет контролируемый уровень перекиси водорода (de Marco et al., 1996). Следовательно, поддержание баланса между перекисью водорода и супероксидным радикалом оказывает существенное влияние, в том числе, и на состав клеточных стенок. Более того, важно учитывать баланс между активностью ферментов СОД/каталаза (КАТ)/ПОД, ответственных как за генерацию, так и за утилизацию АФК. Активность фенилаланинаммиак-лиазы (ФАЛ) играет важную роль в изучаемых процессах. ФАЛ – ключевой фермент вторичного метаболизма, регулирующий синтез флавоноидов – предшественников лигнина (Загоскина и др., 2023). Перекись водорода и супероксидный радикал служат субстратами при радикализации флавоноидов при образовании лигнина (Loix et al., 2017). Кроме того, фенольные соединения необходимы для реакций ПОД и полифенолоксидазы (ПФО).

Выбор уникальных древесных объектов – растений обычной березы повислой *Betula pendula* var. *pendula* и карельской березы *B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti, у которой выделяли безузорчатые и, в разной

степени выраженные, узорчатые участки ствола, позволил нам показать особенности работы широкого спектра ферментов АОС и вторичного метаболизма (ФАЛ, СОД, КАТ, ПОД, ПФО) и особенности накопления метаболитов (перекись водорода, супероксидный радикал, малоновый диальдегид, фенолы, экстрактивные вещества, целлюлоза, лигнин). Уникальность работы заключается в том, что ферменты и метаболиты рассматривали при формировании структурных элементов флоэмы / ксилемы (образование прямослойной древесины) и при формировании слабо дифференцированных паренхимных клеток (образование узорчатой древесины) в следующие периоды: (1) начало ксилогенеза (начало формирования прироста ксилемы), (2) активное формирование древесины, (3) утолщение вторичной клеточной стенки; на анализ отбирали ткани по радиальному вектору: проводящая флоэма и камбиальная зона (фракция 1, F1) – дифференцирующаяся ксилема (фракция 2, F2) – зрелая ксилема (MX).

Обширный анализ, проведенный с применением методов многомерной статистики, позволил нам впервые показать (Nikerova et al., 2024), что метаболический статус (1) F1 лучше всего подходит для разделения узорчатых и безузорчатых участков одного ствола; (2) F2 – позволяет разделить ткани ствола обычной березы, безузорчатые и узорчатые участки ствола карельской березы; (3) MX – для выделения отдельно растений обычной березы повислой и растений карельской березы (без разделения на безузорчатые и узорчатые участки ствола).

Впервые на примере функционирования латеральной меристемы была показана роль баланса супероксидного радикала и перекиси водорода, находящегося под контролем транскрипционного фактора *UPBEAT1*, напрямую влияющего на экспрессию ПОД, которые, тем самым, поддерживают равновесие между субстратной ролью перекиси водорода в ферментативных реакциях и её сигнальной функцией в поддержании баланса с супероксидным радикалом. Кроме того, показано повышение экспрессии генов *PAL*, которые отвечают за образование фенольных соединений и лигнификацию, у карельской березы по сравнению с обычной березой повислой.

Отличия между обычной березой повислой и карельской березой в период утолщения вторичной клеточной стенки, в большей степени, сосредоточены в F2. В ряду растений карельской березы при возрастании степени узорчатости древесины показано, что система *UPBEAT1*- ROS- POD-*PAL*, вероятно, выполняет роль одного из триггеров при изменении направления дифференциации камбиальных производных, что, в большей степени, имеет индикаторную роль в комплексе тканей F1 у взрослых растений в ряду по возрастанию узорчатости. Интенсификация работы АОС и вторичного метаболизма за счет сильной положительной

корреляции активностей ПОД и ПФО, при этом, показывает возрастание субстратной нагрузки на АФК. Впервые отмечено, что возрастание содержания супероксидного радикала под контролем транскрипционного фактора *UPBEAT1* лежит в основе снижения дифференциации структурных элементов на фоне высокой пролиферации и образовании слабо дифференцированных паренхимных клеток у узорчатой карельской березы, а возрастание содержания перекиси водорода – в основе более интенсивных процессов дифференциации у безузорчатых растений.

Такая метаболическая картина подтверждает смещение у карельской березы ксилогенеза в сторону процессов пролиферации, которые сопровождаются с двух сторон потоком АФК и фенольных соединений, вовлекая в интенсивную работу ферменты АОС и вторичного метаболизма, и, соответственно, формируя диагностическое содержание изучаемого спектра метаболитов, которое может характеризовать тот или иной путь ксилогенеза. Отметим, что описанные метаболические схемы впервые рассмотрены в комплексе на древесном растении, карельской березе – уникальном модельном объекте – при отклонениях в развитии латеральных меристем.

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по государственному заданию Института леса Карельского научного центра Российской академии наук и гранта РНФ 22-74-00133. Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

**Влияние конъюгатов хитозана и оксикоричных кислот на
активность антиоксидантных ферментов в проростках ячменя в
оптимальных условиях развития и при кратковременном
воздействии натрий-хлоридного засоления**

**Овчинников И. А.^{А*}, Калацкая Ж. Н.^А, Герасимович К. М.^А,
Рыбинская Е. И.^А, Николайчук В. В.^Б, Гилевская К. С.^Б**

^А Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси г. Минск, Беларусь.

*E-mail: igor-1606@mail.ru

^Б Институт химии новых материалов НАН Беларуси г. Минск, Беларусь

Дефицит влаги, засоленность почв негативно влияют на рост и урожайность растений, вызывая молекулярные, биохимические, физиологические и морфологические изменения, нарушающие рост и развитие растений [1, 2]. Большая часть повреждений в условиях разных стрессовых воздействий чаще всего обусловлена усиленной продукцией активных

фирм кислорода (АФК). АФК образуются и в процессе нормального клеточного метаболизма, но соотношение между продукцией АФК и их элиминацией в стрессовых условиях нарушается. Избыток АФК приводит к быстрой инактивации ферментов в клетках растений, вызывает перекисное окисление липидов, ингибирует синтез ДНК и белков, повреждает нуклеиновые кислоты, разрушает мембраны и в конечном итоге приводит к гибели клеток [3].

Целью данной работы является изучение роста и развития проростков ячменя при обработке семян ячменя конъюгированными формами хитозана с оксикоричными кислотами в условиях солевого стресса.

Семена обрабатывали путем механического перемешивания в растворах конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами в объеме 400 мкл на 20 г семян до равномерного распределения раствора по поверхности. Контролем служили необработанные семена. Растения выращивали рулонным способом до 10-дневного возраста. Для создания солевого стресса рулоны с 5-дневными проростками помещали в 4 %-ный раствор хлорида натрия на 24 ч, а затем переносили в воду. В благоприятных условиях (оптимальные условия) растения весь период выращивали на дистиллированной воде. Биометрические и биохимические параметры оценивали на 6-е сутки (стрессовые условия) и на 10-е сутки (постстрессовый период). Конъюгаты хитозана с феруловой и кофейной кислотой (Х30-ФРК и Х30-КФК) получали карбодиимидным методом с предварительной активацией карбоксильных групп. Активность супероксиддисмутазы определяли методом [4], активность пероксидазы определяли по методу [5], содержание перекиси водорода оценивали по методу [6], содержание малонового диальдегида определяли методом [7], количественное определение белка определяли согласно методике [8]. Статистическую обработку результатов осуществляли с применением общепринятых методик [9].

Отмечено замедление роста у 6-ти дневных проростков ячменя в варианте обработки Х30-КФК в оптимальных условиях развития. Рост и развитие проростков ячменя в варианте обработки Х30-ФРК в оптимальных условиях развития не отличался от контроля. Действие 4%-ного раствора NaCl в течение 24 часов приводило к замедлению роста и развития корней, однако рост листьев сохранялся на уровне контрольного варианта. Не отмечено существенных различий между вариантом Х30-ФРК и контролем, в то время как рост проростков из варианта Х30-КФК ингибировался относительно стрессового контроля в среднем на 10%. В постстрессовый период отмечалось увеличение длины и массы корней у 10-ти дневных проростков в варианте обработки Х30-КФК. Морфометрические показатели в варианте Х30-ФРК были на уровне постстрессового контроля.

Активность СОД и ПО в листьях проростков ячменя при обработках конъюгатами снижалась в среднем на 35% и 30% соответственно относительно контроля на 6-е сутки в оптимальных условиях выращивания, а в корнях, напротив, значительно возрастала, особенно при действии Х30-КФК. Содержание перекиси водорода в листьях и корнях значительно не изменялось при обработке конъюгатами, снизилось содержание МДА на 25% в листьях при обработке Х30-КФК и в корнях на 25% при обработке Х30-ФРК.

Воздействие хлорида натрия привело к снижению активности СОД на 28% относительно бесстрессового контроля в листьях, а ПО оставался на уровне бесстрессового контроля в листьях, наблюдали тенденцию к уменьшению содержания перекиси водорода и МДА. Активность антиоксидантных ферментов значительно повысилась в корнях, а также отмечено снижение содержания перекиси водорода и МДА. В опытных вариантах в условиях стресса не наблюдалось достоверно значимых изменений активности СОД в листьях и разнонаправленное действие ПО – увеличение при обработке Х30-ФРК и снижение вследствие применения Х30-КФК. Содержание МДА в листьях снижалось при обработке Х30-КФК. Однако ферментативная активность ПО и СОД существенно возросла в корнях проростков, при этом не выявлено существенных изменений в содержании перекиси водорода, содержание МДА снизилось в опытном варианте Х30-ФРК.

На 10-е сутки наблюдалось снижение активности СОД, активность ПО не изменялась в листьях проростков из контрольного варианта, не зарегистрировано статистически значимых отличий в содержании перекиси водорода и продуктов ПОЛ в оптимальных условиях выращивания. Однако выявлены существенное увеличение активности ферментов и снижение H_2O_2 и продуктов ПОЛ в корнях растений в оптимальных условиях выращивания.

На 10-е сутки не отмечено влияния обработок на активность антиоксидантных ферментов, зарегистрировано снижение содержания МДА в случае применения Х30-ФРК в листьях растений. В корнях выявлено существенное снижение ПО, другие измеряемые показатели не отличались от контроля. В постстрессовый период в листьях 10-дневных контрольных проростков снижалась активность ПО, а в корнях активность ферментов была существенно выше, чем в условиях стресса. Содержание перекиси и МДА в листьях не отличалось от контроля, а в корнях отмечено снижение значений данных показателей. При этом обработка Х30-КФК повышала активность ПО в листьях, содержание перекиси водорода и продуктов ПОЛ в листьях не изменялись по сравнению с соответствующим контро-

лем. В корнях в постстрессовый период под воздействием конъюгатов активность СОД и ПО значительно ингибировалась, здесь же отмечено и уменьшение содержания перекиси водорода.

На основании полученных данных можно полагать, что увеличение активности антиоксидантных ферментов в корнях под воздействием конъюгатов оксикоричных кислот способствует последующей эффективной адаптации проростков ячменя в период кратковременного солевого воздействия. У проростков ячменя из вариантов с обработкой ХЗ0-ФРК или ХЗ0-КФК при кратковременном действии засоления окислительный стресс развивается слабее, что обеспечивается интенсивным предотвращением избыточной генерации АФК и как следствие в постстрессовый период низкими уровнями содержания перекиси водорода и активности антиоксидантных ферментов в корнях проростков.

Библиографические ссылки

1. Wang W., Vinocur B., Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 218, 1–14.
2. Mohanpuria P., Rana N.K., Yadav S.K. 2007. Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environ. Toxicol.* 22, 368–374.
3. Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Botany*. 2012, 1–26.
4. Полесская, О. Г. Определение активности супероксиддисмутазы / О. Г. Полесская // Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений / Г. В. Сигбатулина [и др.]. – под ред. Н. И. Румянцев – Казань, 2011. – С. 15–17.
5. Бояркин, А. Н. Определение активности пероксидазы / А. Н. Бояркин // Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермиков [и др.]. – Ленинград, 1987. – 3-е изд. – С. 41–43.
6. Bellincampi, D. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants / D. Bellincampi [et al.] // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 122. – P. 1379–1385.
7. Kumar, G. N. M. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers / G. N. M. Kumar, N. R. Knowles // *Plant. Physiol.* – 1993. – V. 102. – P. 115–124.
8. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry* – 1976. – V. 72, № 1–2. – P. 248–254.
9. Grantz S.A. *Primer of Biostatistics* / S.A. Grantz. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 320 p.

Антиоксидантный потенциал растений как ключ к успешной фармакотерапии

**Орлова А. А.^А, Соболева А. В.^А, Силинская С. А.^А, Казантаева М.^Б,
Слукин А. П.^Б, Цветкова Е. В.^Б, Фролов А. А.^А**

^А *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологии, Москва, Россия.*

**E-mail: orlova@ifr.moscow*

^Б *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.*

Продукция свободных радикалов является результатом биохимических процессов, происходящих в клетках живых организмов и является, таким образом, неотъемлемой частью их метаболизма. Однако, нарушение баланса между продукцией свободных радикалов и их нейтрализацией в результате активности антиоксидантных систем организма приводит к развитию окислительного стресса, результатом которого является повреждение клеток организма. В организме человека окислительный стресс может быть вызван различными факторами. К ним относятся как внешние воздействия (например, ультрафиолетовое излучение, радиация, химическое загрязнение окружающей среды), так и внутренние процессы (связанные, например, с хронической инфекцией, ожирением, атеросклерозом). Внутриклеточные механизмы, вовлеченные в регуляцию окислительного стресса, включают как антиоксиданты, которые непосредственно нейтрализуют свободные радикалы, так и целый ряд путей передачи сигнала, которые запускают механизмы адаптации к окислительному стрессу. Окислительный стресс в свою очередь, по свидетельству многочисленных исследований, может являться основным патогенетическим фактором развития заболеваний. Этот эффект может быть опосредован ингибированием ферментов, участвующих в метаболических процессах, повреждениями ДНК, приводящими к мутациям, и нарушениями функции ключевых ферментов и регуляторных белков, модуляции экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в патогенез болезни. Таким образом, исследование путей предотвращения развития окислительного стресса в организме человека является ключом к разработке новых стратегий терапии целого ряда заболеваний.

Антиоксиданты представляют собой химические вещества, способные ингибировать окисление клеточных метаболитов и биополимеров и защищать, таким образом, клетки от повреждений, вызванных свободными радикалами. Растения являются важнейшим источником природных антиоксидантов, характеризующихся широким спектром биологических активностей и практических применений. Благодаря своему природному

происхождению, такие вещества часто проявляют высокую биодоступность и низкую токсичность, что делает их перспективными для использования в фармацевтической практике.

Наиболее известными на сегодняшний день растительными антиоксидантами являются полифенольные соединения, представляющие собой обширный класс природных соединений различной химической структуры (флавоноиды, танины, фенилпропаноиды, лигнаны, стильбены). Механизм антиоксидантного действия полифенольных соединений заключается в их способности быть донорами подвижных атомов водорода фенольных групп, хелаторами металлов, индукторами ферментов, участвующих в антиоксидантной защите организма, а также ингибиторами воспалительных реакций, вызывающих повреждение тканей. Актуальные лабораторные исследования подтверждают потенциальный вклад комплексов и отдельных представителей полифенолов в профилактику и терапию целого ряда заболеваний, связанных с развитием хронического окислительного стресса, в том числе сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных заболеваний, заболеваний мочеполовой и пищеварительной системы.

К сожалению, на сегодняшний день данные об антиоксидантной активности данной группы соединений все еще остаются неполными, что не позволяет в полной мере создавать рекомендации для их применения в области профилактики и терапии конкретных патологических состояний. Кроме того, на данный момент полностью не решен вопрос выбора перспективных источников и промышленной наработки растительных антиоксидантов, не проведены в полной мере исследования взаимосвязи структура-активность для разработки стратегий химического синтеза перспективных молекул. Таким образом, проведение работ в области поиска перспективных растительных антиоксидантов, потенциала их использования в медицинской практике и стратегий получения инновационных лекарственных препаратов и биологически активных добавок на их основе является как никогда перспективным направлением исследования. Работы в данном направлении активно реализуются лабораторией аналитической биохимии и биотехнологии ИФР РАН, где посредством использования современных аналитических методов, в том числе хромато-масс-спектрометрии, препаративной и полупрепаративной ВЭЖХ, спектроскопии ядерного магнитного резонанса, и *in vitro* моделей оценки фармакологического потенциала, был выявлен ряд соединений различных химических групп, обладающих выраженной активностью и перспективных для дальнейшего исследования в области разработки регламентов промышленного получения и создания инновационных лекарственных средств и биологически активных добавок к пище.

Изучение волн активных форм кислорода с помощью генетически кодируемых сенсоров

**Печёрина А. А.^{А*}, Агеева М. Н.^Б, Здобнова Т. А.^А, Брилкина А. А.^Б,
Воденеев В. А.^А**

^А Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, кафедра биофизики, Нижний Новгород, Россия. *E-mail: pechyorinaa@gmail.com

^Б Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, кафедра биохимии и биотехнологии, Нижний Новгород, Россия

Растения подвергаются в течение жизни различным абиотическим и биотическим воздействиям. Эти воздействия могут вызывать формирование активных форм кислорода (АФК), которые негативно влияют на функционирование мембран и ферментов. Но, кроме этого, АФК играют сигнальную функцию у растений. В растении под действием различных стрессоров могут образовываться как местный сигнал АФК, так и распространяющийся в нераздраженные области сигнал. Быстрое распространение на большие расстояния сигнала АФК объясняют его совместным распространением с кальциевым сигналом. Эти две особенности – время и дальность распространения – накладывают ограничение на визуализацию этих сигналов. Визуализация быстрых изменений этих сигналов во всем растении возможна с помощью использования генетически-кодированных сенсоров и систем полномасштабного флуоресцентного имиджинга. Последним на данный момент прорывом в визуализации АФК является генетически кодируемый флуоресцентный H₂O₂-чувствительный сенсор HyPer7. Это ратиометрический сенсор, который имеет пики возбуждения при 400 и 499 нм и пик эмиссии при 516 нм. Отличительной особенностью этого сенсора является его рН-нечувствительность, что позволяет классифицировать получаемый флуоресцентный сигнал как АФК-индуцируемый. Целью работы было создание и проверка полученных растений табака (*Nicotiana tabacum*) флуоресцентным H₂O₂-чувствительным сенсором HyPer7.

Растения табака с сенсором HyPer7 были получены с помощью агробактериальной трансформации. Трансформация листовых фрагментов табака проводилась методом кокультивирования с *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0, несущего бинарную векторную систему рН7WG2-HyPer7, на агаризованной среде Мурасиге и Скуга. После инкубации экспланты пересаживали на среду для регенерации с антибиотиками канамицином, устойчивость к которому несет вектор, и цефотаксимом, воздействию которого подвержены агробактерии. Регенерировавшие

растения проверяли с помощью системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) и получали флуоресцентные изображения клеток.

Далее проверяли работу сенсора HyPer7 в целом растении в установке флуоресцентного имиджинга DVS-03 (ИФТ РАН, Россия) и использовали для возбуждения сенсора светодиоды 395/25 нм и 490/20 нм, флуоресцентные изображения создавали с помощью CMOS-камеры в диапазоне 535/43 нм с экспозицией 2000 мс. Для проверки реакции сенсора на экзогенную H_2O_2 на лист наносили раствор 10% H_2O_2 в 0,05% адьюванте Сильвет 408, в качестве контроля использовали раствор 0,05% Сильвет 408. Соотношение флуоресценции F490/F395 повысилось в месте раздражения в ответ на это раздражение. Затем смотрели распространение волны АФК по всему листу при локальном нагреве части листа элементом Пельтье до 65°C в течение 5 минут. Было зафиксировано быстрое распространяющееся изменение флуоресценции сенсора по всему листу. Параметры волн АФК были сопоставлены с волнами кальция, визуализированными с помощью генетически кодируемого флуоресцентного сенсора Case12, была выполнена оценка этих волн в ответ на один и тот же стимул.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что растения с генетически кодируемыми сенсорами отличный инструмент для визуализации сигнальных веществ как на уровне клеток, так и на уровне целого растения.

Поддержано Программой 10 Экспериментальной Лаборатории Астрофизики и Геофизике НЦФМ

Характеристика показателей антиоксидантной системы трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях загрязнения почвы ионами никеля (II)

Приступа К. В.^{A*}, Кукулянская Т. А.^A, Храмцова Е. А.^B

^A Белорусский государственный университет, кафедра биохимии, Минск, Беларусь.

*E-mail: kristina.pristupa@mail.ru

^B Белорусский государственный университет, кафедра генетики, Минск, Беларусь.

Растения, произрастающие в неблагоприятных условиях, подвергаются сильному стрессу, который может быть обусловлен загрязнением почв тяжёлыми металлами, засухой, засолением, воздействием высоких и низких температур и т.д. [1]. При стрессовых воздействиях значительно повышается интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов. Одним из элементов, способных в высоких концентрациях индуцировать развитие стресса в растениях, является никель (II). Несмотря на

то, что никель – необходимый для растений микроэлемент, его избыточные концентрации являются фактором абиотического стресса для растений. ПДК никеля в почве – 20,0 мг/кг, в среднем по Беларуси в землях содержится 4,8 мг/кг никеля [2]. Активные формы кислорода подавляют активность ряда ферментов, вызывают деградацию клеточных биополимеров, нарушают проницаемость биологических мембран, останавливают клеточный цикл и приводят к развитию апоптоза. В ответ на усиление генерации АФК, как правило, наблюдается активация энзиматических компонентов антиоксидантной защитной системы растений [3, 4].

Развитие абиотического стресса сопровождается образованием избыточного количества стрессового фитогормона – этилена, что приводит к ингибированию процессов роста и развития растений. Одним из подходов к снижению уровня «стрессового» этилена является использование фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминазы (АЦК-дезаминазы), который синтезируют некоторые ризобактерии. Фермент АЦК-дезаминаза, кодируемый геном *acdS*, разлагает предшественник этилена – АЦК – до аммиака и α -кетобутирата. Устойчивость растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, вызывающим стресс, в значительной степени обеспечивается функционированием антиоксидантной системы. В настоящее время во многих странах проводится изучение состояния антиоксидантной системы растений под влиянием избыточной концентрации тяжелых металлов в почве, а также создаются трансгенные формы растений, которые характеризуются сверхэкспрессией генов, кодирующих ферменты антиоксидантной защиты [5, 6]. Целью настоящей работы является изучение влияния хлорида никеля (II), внесенного в почву, на активность ряда ферментов в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37.

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37. Предметом исследования являлись общая антиоксидантная активность данных растений, а также активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, аскорбатпероксидазы) и содержание низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, глутатиона) в исследуемых растениях. Растения были разделены на 2 серии: контрольная серия (без обработки почвы); опытная серия (однократная обработка почвы NiCl_2 в концентрации 20 мкг на 1 кг почвы). Каждая серия включала в себя 10 трансгенных растений линий 4-12 и 10- 38, а также 10 нетрансгенных растений *Nicotiana tabacum*.

Создание трансгенных растений осуществлялось согласно методике, описанной А.А. Мельниковой и соавторами [7]. Трансгенные растения *N. tabacum* были получены с использованием векторной конструкции pBI121-acdS, несущей ген *acdS* бактерий *Pseudomonas putida* B-37, который находится под контролем конститутивного CaMV 35S промотора. Генетическая конструкция была введена в клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Полученный агробактериальный штамм был использован для трансформации каллусов *N. tabacum*.

Семена растений стерильно высевали на увлажненные фильтры и в течение 2 суток выдерживали при $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в темноте для прорастания. Затем проростки помещали в климатикамеру с температурой $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и 16-часовым световым днем. Через 14 суток растения пересаживали в стаканчики со стерильной почвой (50 г). Дальнейшее культивирование производили при температуре $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$, влажности 70-80%, 16-часовом световом дне в течение 8 недель.

Растительный материал (0,5 г) гомогенизировали в 0,1 моль/л калий-фосфатном буфере (pH 7,8), затем объем доводили до 10 мл. Полученные гомогенаты трижды по 15 с подвергали ультразвуковому воздействию при частоте 11 кГц с помощью дезинтегратора УЗДН-2Т (НПП «Академприбор», Россия), после чего центрифугировали в течение 15 мин при 10 000 об/мин. Все процедуры производили на холоде (4°C). Клеточные экстракты использовали для определения общей антиоксидантной активности, а также активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла, содержания низкомолекулярных антиоксидантов и белка в растениях. Содержание белка в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм. Общую антиоксидантную активность растительных экстрактов оценивали по степени ингибирования окисления парафенилендиамина пероксидом водорода с применением спектрофотометрического метода при длине волны 530 нм. Активность супероксиддисмутазы оценивали по степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина. Определение активности каталазы проводили методом, основанным на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс при $\lambda=410$ нм. Пероксидазную активность определяли кинетическим методом, основанном на определении скорости накопления продуктов окисления бензидина пероксидом водорода в присутствии экстракта растений. Активность аскорбатпероксидазы (APX) в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу Verma, Dubey при длине волны 290 нм. Активность глутатионпероксидазы (GPX) в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически по количеству накопленного окисленного глутатиона

в среде инкубации при длине волны 260 нм. Активность глутатионредуктазы (GR) в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по количеству НАДФН, образующегося при восстановлении окисленного глутатиона в среде инкубации, при длине волны 340 нм. Общее содержание фенольных соединений в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу *Singleton* при длине волны 765 нм. Общее содержание флавоноидов в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по методу *Quettier* при длине волны 415 нм. Содержание аскорбиновой кислоты в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически с использованием метода *Das*, который основан на способности фосфомолибдата восстанавливаться данной кислотой до молибдата синего цвета. Измерение проводили при длине волны 660 нм. Содержание восстановленного глутатиона в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Элмана при длине волны 412 нм.

Результаты и обсуждение. Воздействие никеля на растение проявляется в виде множества ответных реакций, которые нейтрализуют избыток поступающего в растение металла. Общая реакция на присутствие избытка никеля в среде – это увеличение содержания АФК, а также низкомолекулярных антиоксидантов и ферментов, которые противодействуют накоплению АФК и способствуют выживанию растений в условиях повышенной концентрации металла.

Несмотря на то, что данных о токсичности никеля для растений много, точный механизм действия этого металла до сих пор не установлен. Есть два предполагаемых механизма токсичности никеля – оба они являются непрямыми, так как никель не является металлом, который участвует в окислительно-восстановительных реакциях. Во-первых, считается, что никель способен взаимодействовать с другими микроэлементами-металлами, необходимыми для растения. В избыточных количествах никель способен нарушать всасывание и транспорт двухвалентных металлов, что приводит к возникновению их дефицита, из-за чего и развиваются различные токсические эффекты. Также стоит учесть, что железо, медь, цинк и марганец являются элементами, ассоциированными со многими ферментами, например, СОД или каталазой. Избыток никеля способствует снижению концентрации железа, меди и цинка в растительной клетке, что нарушает биосинтез этих ферментов и в итоге приводит к развитию окислительного стресса. Во-вторых, избыточное накопление никеля в растении и, как следствие, снижение активности СОД, аскорбатоксидазы, глутатионпероксидазы, каталазы и других ферментов-антиоксидантов, приведет к генерации АФК. Никель-индуцированные АФК вызывают ПОЛ, окисление белков, деструкцию ферментов и повреждение ДНК [8].

Нами было проведено определение активностей ферментов и оценены биохимические показатели, которые характеризуют состояние антиоксидантной системы. Исходная общая антиоксидантная активность (ОАА), которая выражается степенью инактивации окисления парафенилендиамина пероксидом водорода антиоксидантами растений, в нетрансгенных растениях выше, чем в трансгенных формах в 1,1 раз. Установлено, что при внесении в почву Ni^{2+} увеличивается общая антиоксидантная активность исследуемых растений. Показано, что при выращивании растений на почве с никелем (II) общая антиоксидантная активность повысилась в 1,25 раз, а для трансгенных растений обеих линий – в 1,13 раз по сравнению с контрольными сериями растений соответственно. Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный *acdS*-ген, в меньшем количестве образуются АФК, следовательно, они характеризуются более низкой интенсивностью свободнорадикальных окислительных процессов по сравнению с нетрансгенными.

Нетрансгенные растения *Nicotiana tabacum* отличались более высокими показателями активности СОД и содержанием ТБК-активных продуктов по сравнению с трансгенными образцами при обработке почвы ионами никеля (II). Показано, что при выращивании растений в условиях абиотического стресса в нетрансгенных растениях активность СОД увеличилась в 3,6 раз, в трансгенных – в 1,7 раз соответственно по сравнению с контрольной серией, интенсивность ПОЛ в нетрансгенных растениях выросло в 4,2 раз, в трансгенных – в 1,6 раз соответственно по сравнению с контрольной серией. Активность каталазы в условиях абиотического стресса повышалась в 2,7 раз в нетрансгенных растениях и в 1,5 раза в трансгенных по сравнению с контрольной серией. Пероксидазная активность в условиях загрязнения почвы никелем (II) увеличилась в 3 раза для нетрансгенных растений и в 1,6 раз для трансгенных растений соответственно по сравнению с контрольной серией.

Полученные нами данные об активности каталазы, СОД и пероксидазы в растениях *Nicotiana tabacum* могут свидетельствовать об активации ферментов антиоксидантной защиты при внесении в почву ионов никеля (II). Это может быть связано с усилением процессов свободного окисления, сопровождающихся образованием АФК. Однако, в трансгенных растениях активность ферментов при загрязнении почвы увеличивается в меньшей степени, чем в нетрансгенных формах. Это может быть обусловлено тем, что в трансгенных растениях снижается образование АФК, в частности пероксида водорода, который является субстратом, как для каталазы, так и для пероксидазы. Поэтому трансгенные растения имеют более низкую активность данных ферментов по сравнению с нетрансгенными при обработке почвы ионами никеля (II).

Также нами было изучено влияние абиотического стресса на общее содержание фенольных соединений (ФС) и флавоноидов. Присутствие в почве ионов никеля (II) приводило к повышению содержания фенольных соединений, в том числе и флавоноидов: содержание ФС выросло в 1,5 раза в нетрансгенных растениях и в 2 раза в трансгенных по сравнению с контрольной серией. Содержание флавоноидов в условиях загрязнения почвы никелем (II) увеличилось в 1,9 раз в нетрансгенных и в 2,4 раз в трансгенных формах.

О функционировании антиоксидантной системы организма и интенсивности свободнорадикальных окислительных процессов, вызванных, в первую очередь, действием токсичных веществ можно судить по состоянию системы аскорбат-глутатионового цикла. В связи с этим на следующем этапе нашей работы было определено содержание аскорбиновой кислоты и глутатиона (мг и ммоль, соответственно, на 1 г растительного материала) во всех сериях.

При внесении в почву ионов Ni^{2+} содержание аскорбиновой кислоты в растениях повышается: в нетрансгенных растениях в 1,6 раз, в трансгенных растениях линии 4-12 – в 1,7 раз и в 1,9 раз в образцах линии 10-38. Очевидно, что в трансгенных формах растений в присутствии Ni^{2+} в почве содержание аскорбиновой кислоты достоверно выше, чем в нетрансгенных растениях, тогда как в образцах, выращенных в нормальных условиях, уровень витамина С достоверно не различается. Содержание глутатиона в растениях при абиотическом стрессе, вызванном присутствием NiCl_2 в почве, также возрастало. В нетрансгенных растениях содержание глутатиона увеличилось в 1,4 раз, а в трансгенных растениях обеих серий – в 1,6 раз.

Также была определена активность основных ферментов аскорбат-глутатионового цикла: аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в исследуемых образцах. Активность аскорбатпероксидазы во всех образцах повышалась при выращивании их в почве с NiCl_2 . Однако, активность данного фермента в трансгенных растениях повышается в меньшей степени, чем в нетрансгенных формах. В нетрансгенных растениях активность аскорбатпероксидазы возросла в 4 раза после внесения в почву никеля (II). В трансгенных растениях линии активность фермента увеличилась в 3 раза.

Активность глутатионпероксидазы в нетрансгенных растениях увеличилась в 2,4 раз, а в трансгенных формах была в 1,5 раза после внесения в почву никеля (II). Активность глутатионредуктазы в растениях при внесении в почву Ni^{2+} также увеличилась, однако, в трансгенных образцах повышение активности фермента происходило в меньшей степени. В нетрансгенных растениях активность глутатионредуктазы выросла в 2,5 раза.

при обработке почвы ионами никеля (II). В трансгенных растениях активность фермента повысилась в 1,7 раза.

Полученные результаты свидетельствуют, что трансгенные и нетрансгенные формы растений отвечают на абиотическое стрессовое воздействие увеличением содержания низкомолекулярных антиоксидантов, в частности, аскорбата и глутатиона. Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный *acdS*-ген, в меньшем количестве образуются пероксид водорода, который является одним из субстратов для пероксидаз.

Данные об активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла согласуются с тем, что трансгенные растения *Nicotiana tabacum* характеризовались более низкой активностью ферментативных антиоксидантов (пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы) и интенсивностью процессов перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансгенными формами в условиях загрязнения почвы ионами Ni^{2+} . Внесение в почву никеля (II) приводило к повышению общей антиоксидантной активности исследуемых растений, что наблюдалось также в присутствии в почве ряда других тяжелых металлов. Также ранее нами было показано, что при внесении в почву солей Cu^{2+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} трансгенные растения *Nicotiana tabacum* имели более высокое содержание низкомолекулярных компонентов (глутатиона, аскорбиновой кислоты) и более низкую активность ферментов (APX, GPX, GR) аскорбат-глутатионового цикла по сравнению с нетрансгенными формами [9, 10].

В литературе имеются также данные, что трансгенные растения табака, характеризующиеся сверхэкспрессией супероксиддисмутазы, демонстрировали увеличение активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Эти растения отличались повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, только если другие антиоксиданты (в частности, глутатион и аскорбат) также присутствовали в клетке в высоких концентрациях [11].

Следует также отметить, что полученные результаты согласуются с тем, что для ряда растений, инокулированными бактериями, которые несли в своем геноме *acds*-ген, в условиях абиотического стресса наблюдалась более низкая активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла [12].

Таким образом, на основании полученных данных, характеризующих состояние антиоксидантной системы трансгенных и нетрансгенных растений *Nicotiana tabacum*, можно сделать заключение о том, что трансгенные растения, которые имеют в своем геноме бактериальный *acdS*-ген и способные синтезировать АЦК-деаминазу, в меньшей степени подвержены воздействию повышенных концентраций ионов никеля (II) в почве. Сле-

дует отметить, что трансгенные растения *N. tabacum*, которые выращивались на загрязненной почве, имели лучшие ростовые характеристики (бóльшая длина стебля, корня) и более высокую биомассу, чем нетрансгенные образцы.

Библиографические ссылки

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312.
2. Hontzeas N., Hontzeas C.E., Glick B.R. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006. Vol. 24. №4. P. 420–426.
3. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;153(1–3):83–104.
4. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008;51(3):167–173.
5. Sergeeva E., Shan S., Glick B.R. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006. Vol. 22. № 3. P. 277–282.
6. Lee Y.P., Kim S.H., Bang J.W., Lee H.S., Kwak S.S., Kwon S.Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007. Vol. 26. №5. P. 591–598.
7. Мельникова А.А, Храмцова Е.А, Королева Е.С, Руткевич Д.А, Кукулянская Т.А. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019. №1. С. 45–53.
8. Hassan, M.U., Chattha, M.U., Khan, I. *et al.* Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities — a review. *Environ Sci Pollut Res* 2019. Vol. 26, P. 12673–12688 (2019).
9. Приступа К.В., Кукулянская Т.А., Храмцова Е.А. Анализ содержания фенольных антиоксидантов и аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020. №1. С.20–26.
10. Приступа К.В., Кукулянская Т.А., Храмцова Е.А. Изучение состояния компонентов аскорбат-глутатионового цикла в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021. №2. С.11–18.
11. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2016;184:13–24.
12. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2012;32:245–258.

Анализ физиологических характеристик растений *Pisum sativum* с использованием техники цифрового фенотипирования

**Прохорчик П. О.^{A*}, Бондаренко В. Ю.^A, Кошиц Т. О.^A, Савич А. С.^A,
Демидчик В. В.^A**

^A Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: polina.prohortchik@gmail.com

Глобальное изменение климата и неправильное управление земельными ресурсами приводят к увеличению площади засоленных почв. Повышенное содержание солей в почве индуцирует осмотический и ионный стресс у растений, что ухудшает их способность к поглощению воды и питательных веществ, а также нарушает обменные процессы. Эти негативные эффекты снижают урожайность и качество сельскохозяйственных культур, увеличивая потребность в ресурсах и затраты на сельское хозяйство. [1].

Способность растений переносить засоление определяется множеством биохимических и физиологических механизмов, защищающих функции клеток, включая регулирование водного баланса и поддержание ионного гомеостаза [2]. Окислительно-восстановительный гомеостаз является фундаментальным свойством клеток, включающим контроль образования активных форм кислорода (АФК), распознавание отклонений от нормального окислительно-восстановительного состояния клетки.

Для углубленного изучения адаптивных механизмов растений к засолению и других стрессовых факторов среды, необходимо использовать современные методы анализа фенотипа. В этом контексте особое внимание уделяется технике цифрового фенотипирования, которая позволяет проводить детальный анализ фенотипических изменений у растений, обеспечивая более точное понимание их реакций на внешние воздействия.

Целью исследования являлся анализ изменения фенотипических признаков *Pisum sativum* L. в ответ на солевой стресс с использованием подходов компьютерного зрения и машинного обучения.

Для исследования семена гороха *Pisum sativum* сорта MERAVIGLIA DI KELVEDON проращивались при температуре 24°C в течение 3 суток рулонным методом. После появления гипокотилия растения пересаживались в различные типы почвенных смесей (песок, вермикулит, смесь песка и вермикулита в соотношении 1:1 (V:V)). На 5-й день проращивания растения обрабатывали растворами NaCl (0,1 М и 0,3 М) в количестве 25 мл на один культуральный сосуд 3 раза в неделю соответственно плану расстановки эксперимента. Контрольные растения обрабатывали дистиллированной водой. Для поддержания оптимального температурного режима в 21°C использовалась система климат-контроля и вентиляции.

Феномные данные регистрировались в течение 3 недель с помощью феномной система Phenospex TraitFinder. Мультиспектральные 3D-лазерные сканеры PlantEye F600 использовались для вычисления цифровой биомассы, высоты, объема листьев и спектральных индексов (NDVI, NPCI, GLI и PSRI), измеряя отражательную способность в красном и ближнем инфракрасном областях спектра. Эти параметры предоставляют информацию о физиологическом состоянии растений и уровне стресса. Для анализа фенотипических различий между обработками использовались стандартные методы вариационной статистики.

Показано, что обработка растений *Pisum sativum* 0,3 М NaCl вызывала уменьшение нормализованного вегетационного индекса (NDVI) на 20 - 40% по сравнению с контролем в песке, на 15 - 25% в вермикулите, и на 10 - 30% в смешанном субстрате. Нормализованный хлорофилльный индекс (NPCI) растений *Pisum sativum*, подвергшихся засолению, уменьшился на 30 - 40% по сравнению с контролем в песке, на 20 - 30% в вермикулите, и на 25 - 35% в смешанном субстрате. Индекс "старения" (PSRI) растений *Pisum sativum*, подвергшихся засолению, увеличился на 15 - 25% по сравнению с контролем в песке, не более чем на 5% в вермикулите и в смешанном субстрате. Индекс зеленых листьев (GLI) растений *Pisum sativum*, подвергшихся засолению, уменьшился на 30 - 40% по сравнению с контролем в песке, на 20 - 30% в вермикулите, и на 25 - 35% в смешанном субстрате.

Более низкие концентрации соли (0,1 М NaCl) оказывали менее выраженный эффект на спектральные и морфологические параметры растений. Полученные данные продемонстрировали замедление роста и гибель клеток в условиях засоления.

Библиографические ссылки

1. Hossain, M.S. Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress / M.S. Hossain, K.-J. Dietz // Front. Plant Sci. – 2016. – Т. 7.
2. Physiological and biochemical mechanisms of the ornamental *Eugenia myrtifolia* L. plants for coping with NaCl stress and recovery / J.-R. Acosta-Motos [et al.] // Planta. – 2015. – Vol. 242, № 4. – P. 829-846.

**Редокс-состояние подвижных переносчиков электронов
хлоропластов определяет ответную реакцию фотосинтетического
аппарата *Hordeum vulgare* при тепловом стрессе**

Пшибытко Н. Л.^{А*}

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: Pshybytko@bsu.by

Температура является одним из основных стрессовых факторов, ограничивающих фотосинтетическую активность, рост и продуктивность растений. Наряду с термоиндуцированным лимитированием фотосинтеза за счет снижения устьичной проводимости, показаны многочисленные молекулярные механизмы температурно-зависимых изменений в пигмент-белковых комплексах тилакоидных мембран, включая диссоциацию свето-собирающего комплекса, разрушение белка D1 реакционного центра ФС2, высвобождение Mn-стабилизирующего 33-кДа белка из корового центра ФС2, выход Mn из водоразлагающего комплекса, изменение пространственной конфигурации Q_B-связывающего сайта ФС2. В настоящей работе протестирована гипотеза, согласно которой редокс-состояние подвижных переносчиков электронов, пластохинонов и ферредоксинов, отражающее состояние электрон-транспортной цепи хлоропластов, регулирует ее функциональную активность при тепловом стрессе. Исследованы параметры флуоресценции хлорофилла *a*, характеристики окислительно-восстановительного состояния P700, пластохинонов, ферредоксина и пластоцианина в проростках *Hordeum vulgare* L. Обнаружено, что воздействие повышенной температуры (40°C 3 ч) снижало уровень восстановленных пластохиноновых молекул, уменьшало размер фотоактивного и увеличивало нефотоактивный пул пластохинонов. С использованием искусственных хинонов, 2,6-дихлор-1,4-бензохинона и 2,6-диметоксибензохинона показано, что термоиндуцированное подавление потока электронов между Q_A⁻ и Q_B было обусловлено увеличением уровня восстановленности пластохинонового пула. Кроме того, тепловая обработка вызывала накопление восстановленного ферредоксина и активизацию альтернативных потоков электронов от ферредоксина с участием пластохинонов. Повышенная температура ингибировала циклический поток электронов, катализируемый ферредоксин-пластохинон редуктазой (FQR). Вызванное нагреванием снижение циклического и линейного потока электронов компенсировалось активацией транспорта электронов, катализируемого НАДН дегидрогеназа-подобным комплексом (NDH). Также было выявлено термоиндуцированное повышение транскрипции *ndhA* и *ndhF* генов, кодирующих субъединицы NDH. Инфильтрация листьев 2,6-дихлорфено-

линдифенолом, искусственным акцептором электронов ФС1, предотвращала термоиндуцированное снижение восстановленности пластохинонов и изменения FQR-зависимого циклического электронного транспорта и qE. В то же время, данная обработка не влияла на термоиндуцированное подавление линейного электронного транспорта и перераспределение пластохинонов из фотоактивного в нефотоактивный пул. На основании полученных данных сделан вывод, что снижение эффективности донирования электронов от пластоцианина к ФС1 и акцептирования электронов ферредоксином могло быть причиной термоиндуцированного подавления FQR-зависимого циклического электронного транспорта, в то время как уменьшение размера фотоактивного пула пластохинонов потенциально являлось причиной ингибирования линейного потока электронов при тепловом стрессе.

Особенности пигментного состава лишайников *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. и *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr

**Рассабина А. Е.^{А*}, Хабибрахманова В. Р.^А, Хайруллина А. Ф.^А,
Минибаева Ф. В.^А**

^А Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия.

*E-mail: AERassabina@yandex.ru

Лишайники с давних времен являются ценным источником вторичных метаболитов, которые широко используют в качестве лекарственных препаратов. Лишайники произрастают на различной территории и характеризуются многообразием пигментного состава. Как известно, пигменты таллома лишайника предотвращают повреждения на клеточном уровне при действии интенсивного УФ-излучения [1]. Выявление физико-химических свойств и биологической активности пигментов лишайников будет способствовать пониманию защитной роли пигментов в жизнедеятельности этих симбиотических ассоциатов.

Нами были выделены и изучены такие пигменты, как меланин из лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. и париедин из лишайника *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr. Меланин, являясь природным полимером фенольной и индол-хиноидной природы, обладает сложной нерегулярной структурой и высоким потенциалом биологической активности. Париедин представляет собой оранжевый антрахиноновый пигмент природного происхождения (1,8-дигидрокси-3-метокси-6-метил-9,10-антрахинон) [2]. Париедин известен тем, что проявляет антиоксидантную и антибактериальную активность.

Ранее было показано, что меланин и париедин защищают фотосинтетический аппарат лишайников от повреждения высоким уровнем освещенности. Использование качественных реакций, микроскопических и спектрофотометрических методов анализа позволили охарактеризовать состав и свойства меланина и париедина в талломах лишайников. Нами были разработаны подходы к выделению меланиновых ассоциатов из талломов лишайника *L. pulmonaria* с наименьшим содержанием клеточных полисахаридов и белков. Подобраны условия выделения париедина из лишайника *X. parietina* и получены азеотропные смеси данного пигмента.

Выявлены фотопротекторные, антиоксидантные и сорбционные свойства *in vitro* меланина, выделенного из лишайника *L. pulmonaria*. Методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) были установлены размеры частиц меланина и париедина, оценена их агрегативная устойчивость и проявление супрамолекулярной природы. Меланин и париедин обладали супрамолекулярными свойствами и был способен к перестройке в зависимости от условий дисперсионной среды. В меланине обнаружены структуры с неспаренными свободными электронами со значением g -фактора от 2,00343-2,00299 и $\Delta H=3,5-5,7$ Гс, что обуславливает его парамагнитные свойства. С помощью ИК-спектроскопии было идентифицировано наличие в меланинах гидроксильных и карбоксильных функциональных групп. На основе обнаруженных физико-химических свойств и активных функциональных групп в структуре меланина, проведен анализ сорбционной активности в отношении синтетических красителей метиленовый синий, ремазол и индигокармин. В процессе адсорбции красители легко взаимодействовали с функциональными группами меланина, а также с его ароматическими полисопряженными структурами. С помощью рентгенофлуоресцентного анализа установлено наличие в меланине металлов переменной валентности, что указывает на высокий потенциал сорбционной активности меланина в талломе лишайника. Проанализированы фотопоглотительные и хелатирующие свойства, выделенного из таллома париедина, а также оценена его водоудерживающая способность. Показано, что меланин и париедин вносит вклад в защиту таллома лишайников от обезвоживания. В результате, выявленные антиоксидантные, хелатирующие и сорбционные свойства меланина и париедина обуславливают роль этих пигментов в формировании устойчивости лишайников к действию неблагоприятных факторов среды, а также открывают перспективы их практического применения.

Работа выполнена в рамках гос. задания ФИЦ КазНЦ РАН и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-14-00327.

Библиографические ссылки

1. Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., Nybakken, L., Bilger, W. UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist*, 158 (1), 91-100 (2003).
2. Comini, L.R., Morán Vieyra, F.E., Mignone, R.A. *et al.* Parietin: an efficient photo-screening pigment *in vivo* with good photosensitizing and photodynamic antibacterial effects *in vitro*. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **16**, 201–210 (2017).

Оценка эндогенного антиоксидантного потенциала продуктов пищевой биотехнологии при помощи спектроскопии электронного парамагнитного резонанса

Русакович А. А.^А, Белозор А. С.^А, Демидчик В. В.^{А*}

^А Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.

*E-mail: dzemidchyk@bsu.by

В процессе хранения в продуктах пищевой биотехнологии происходят окислительные процессы, приводящие к снижению их полезных свойств и порче. В основе окисления лежит генерация активных форм кислорода (АФК), которая может быть вызвана поступлением кислорода через элементы упаковки либо преобразованием внутренних кислородсодержащих соединений.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в настоящее время широко применяется для анализа свободнорадикальных процессов в продуктах пищевой биотехнологии. В представленной работе с использованием методов ЭПР-спектроскопии был проведен анализ окислительной стабильности различных сортов пива и пищевых растительных масел по их эндогенному антиоксидантному потенциалу (ЭАП), показателю величина которого коррелирует со временем хранения и вкусовыми качествами продукта. Окислительная стабильность продукта зависит от его способности предотвращать образование свободных радикалов, и в значительной степени определяется содержанием в нем антиоксидантов. Определение антиоксидантного потенциала позволяет оценить влияние отдельных компонентов, стадий производства, типов упаковки и условий хранения на устойчивость продукта к окислению.

Методика оценки окислительной стабильности основана на обнаружении свободных радикалов в образце с применением спиновых ловушек α -фенил-N-трет-бутилнитрон (« α -phenyl-N-tert-butyl nitron»; PBN) и α -4-пиридил-1-оксид-N-трет-бутилнитрон (« α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron»; POBN), формирующих стабильные спиновые аддукты с гидроксильным радикалом. Использовалась техника ускоренного старения

образцов пива и масла путем их инкубирования при повышенной температуре с параллельной регистрацией накопления свободнорадикальных аддуктов. Для количественной характеристики сигнала применялось двойное интегрирование первой производной ЭПР-спектра, а значение ЭАП рассчитывалось по точке перегиба кинетической кривой накопления спинового аддукта при нагревании.

Была проведена оценка влияния различных условий температуры и освещения, а также времени хранения на уровень свободных радикалов в пиве. Выявлены отличия в величине эндогенного антиоксидантного потенциала для пива из разных типов упаковки (полиэтиленовая бутылка, стеклянная бутылка и жестяная банка). Протестировано воздействие важнейших антиоксидантов на окислительную стабильность светлого и темного пива производства компании "Криница". Показано, что хранение пива в отсутствие освещения, при пониженных температурах и в стеклянной таре способствует сохранению его окислительной стабильности. Более высокое содержание свободных радикалов было показано для образцов темного пива. L-аскорбиновая кислота продемонстрировала наибольший эффект по стабилизации пива (увеличение значений ЭАП в сравнении с контролем) среди протестированных антиоксидантов.

Также была проведена оценка окислительной стабильности ряда широко употребляемых в пищу растительных масел (подсолнечного, льняного, рапсового) и влияния антиоксидантов различной природы на уровень ЭАП образцов. Среди протестированных образцов масла наименьшую стабильность продемонстрировало подсолнечное. При добавлении к нему спиртового экстракта розмарина интенсивность ЭПР-сигнала снижалась в значительной степени, по сравнению с контрольным образцом. Аскорбиновая кислота природного происхождения продемонстрировала наибольшую эффективность по увеличению окислительной стабильности подсолнечного масла.

Использование компьютерного зрения и сверточных нейронных сетей для фенотипического анализа ростовых процессов

Arabidopsis thaliana

Савицкий А. С.^{А*}, Демидчик В. В.^А

^А *Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: artiom.savitski@yandex.ru*

Для адаптации к глобальному изменению климата современное сельское хозяйство нуждается в новых видах культурных растений, способных

противостоять высоким температурам, засухе и засолению [1]. Крайне важно систематически изучать изменения физических и физиологических характеристик растений в стрессовых условиях. Для изучения фенотипов растений на цифровом уровне возникла новая область, известная как феномика, объединяющая физиологию растений и биоинформатику. Цифровая феномика предполагает автоматизацию сбора и анализа фенотипических данных растений с использованием методов компьютерного зрения, машинного обучения и нейронных сетей. Внедрение цифровых технологий фенотипирования растений произвело революцию в методах селекции растений и исследованиях морфологии растений [2]. Целью данной работы является разработка комплекса компьютерных программ, а также обучение и адаптация сверточной нейронной сети, что позволяет автоматизировать сбор и произвести глубокий анализ цифровых изображений растений *Arabidopsis thaliana* в условиях *in vitro*.

В работе использовалась культура молодых растений *Arabidopsis thaliana*, выращенная в *in vitro*. Растения выращивались на стандартной питательной среде Мурасиге-Скуга компании Duchefa (Харлем, Нидерланды) [3]. Чашки с высаженными семенами выдерживались в течение 2 сут при температуре 4°C в темноте. Это требовалось для прерывания периода покоя семян. В дальнейшем чашки перемещались в стерильный ростовой кабинет с контролируемыми параметрами освещенности (100 $\mu\text{моль фотонов м}^{-2} \text{с}^{-1}$, световой режим 16/8, 20В) и температуры (22°C), где они выращивались в течение 6-12 дней. В течение всего периода выращивания чашки размещались вертикально, что способствовало развитию корней проростков на поверхности питательной среды [3]. Фотографирование производилось в софтбоксе с синим антибликовым фоном и регулируемым освещением, позволяющий получать высококонтрастные изображения растений. Съемка проводилась на цифровую камеру Nikon D3400. Для получения изображений использовался софтбокс для фотографирования с синим антибликовым фоном и регулируемым освещением, позволяющий получать высококонтрастные изображения растительных объектов. Съемка выполнялась на цифровую камеру Sony FDR-AX700. Работа проводилась с использованием библиотеки компьютерного зрения OpenCV, которая включает различные инструменты для анализа изображений [4]. Также использовалась библиотека машинного обучения scikit-learn для обучения предсказательной модели, которая принимает на вход площади листьев и корней и выдает в качестве предсказания значения сырой и сухой биомассы [4]. Для работы с нейронной сетью использовался фреймворк глубокого обучения pytorch [5]. В качестве инструмента раз-

метки данных для обучения сверточной нейронной сети была использована программа labelme, позволяющая генерировать аннотации изображений в полуавтоматическом режиме [6].

В ходе проведенной работы был разработан комплекс алгоритмов, а также обучена нейронная сеть позволяющий обнаруживать корни и листья на изображениях и анализировать их. Была обучена нейросеть Mask R-CNN на основе Resnet-50, позволяющая извлекать маски листьев и корней с изображений. Предсказанные в результате работы нейросети изображения масок корней и листьев использовались в дальнейшем для анализа. Программа способна измерять площадь зеленой части растения и корней и создавать отчет с вычисленными параметрами. Отчет может использоваться для обучения модели предсказания. Также для обучения модели необходимо было получить экспериментально измеренные значения масс как сырых, так и сухих биомасс листьев и корней. После обучения модель достигла точности 96,6% по метрике R-квадрата на тестовом наборе данных. Программа разработана для автоматической работы, пользователю требуется только предоставить исходные изображения. На рисунке 1 показаны полученные в результате работы программы данные по приросту площадей видимой зеленой части.

Размер листа связан со свойствами энергетического и водного баланса всего растения. Вариация размеров листьев связана с климатическими, географическими факторами, к примеру, значением высоты над уровнем моря, тепловым стрессом, холодным стрессом, засухой и ионизирующим излучением [7]. В случае влияния большого количества стрессоров на растение наблюдается уменьшение размеров листа. Аналогичные изменения происходят в корнях [7].

В результате проведенной работы разработано программное обеспечение на языке Python для анализа изображений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в культуре *in vitro*. Создана выборка аннотированных изображений для обучения нейронной сети. Обучена сверточная нейронная сеть, позволяющая извлекать с изображения маски листьев и корней. Создана предсказательная модель сырой и сухой биомассы корней и листьев *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., которая принимает на вход значения площадей корней и листьев, найденных в ходе анализа изображений. Разработанное программное обеспечение подходит для применения в качестве неинвазивного метода анализа роста и развития *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в культуре *in vitro* для сбора фенотипических данных с целью их дальнейшего анализа посредством методов цифровой феномики.

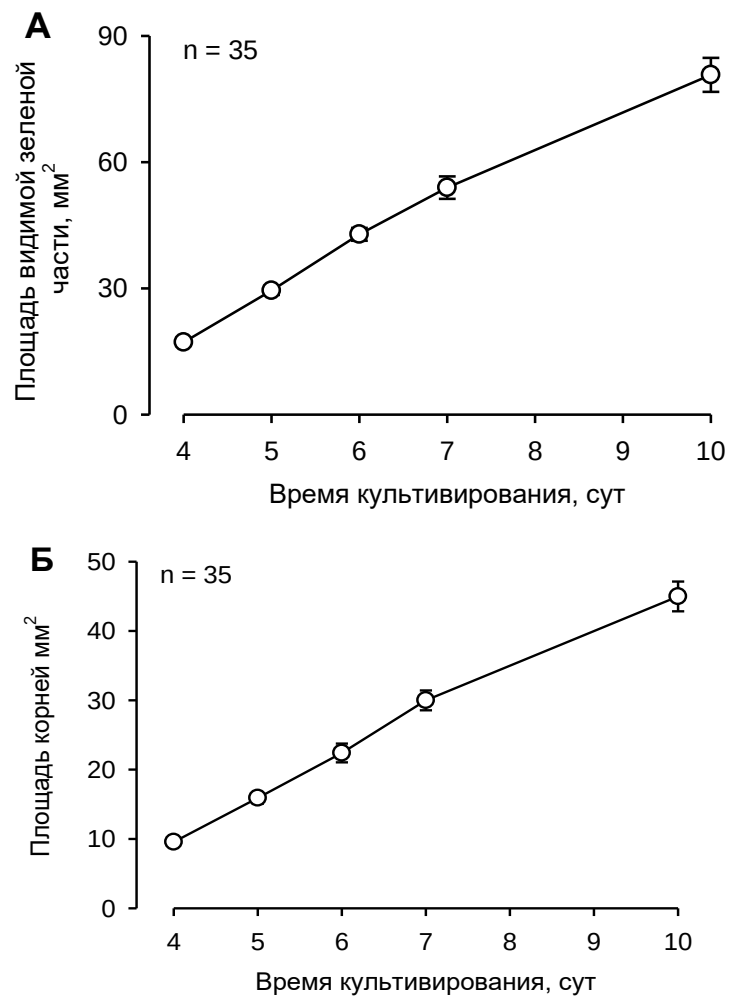


Рис. 1. Изменение площади видимой зеленой части (А) и площади корней (Б) *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Данные являются средними ($\pm S\bar{x}$) для 35 измерений, каждое из которых представляет собой результат анализа морфологических параметров растений одной чашки (культура целых растений)

Библиографические ссылки

1. Watt M. et al. Phenotyping: new windows into the plant for breeders // Annual review of plant biology. – 2020. – Т. 71. – С. 689-712.
2. Sanchez-Serrano J. J., Salinas J. (ed.). Arabidopsis protocols. – London : Humana Press, 2014.
3. Dawson-Howe K. A practical introduction to computer vision with opencv. – John Wiley & Sons, 2014.
4. Lee U. et al. An automated, high-throughput plant phenotyping system using machine learning-based plant segmentation and image analysis // PloS one. – 2018. – Т. 13. – №. 4. – С. e0196615.
5. Imambi S., Prakash K. B., Kanagachidambaresan G. R. PyTorch // Programming with TensorFlow: solution for edge computing applications. – 2021. – С. 87-104.
6. Russell B. C. et al. LabelMe: a database and web-based tool for image annotation // International journal of computer vision. – 2008. – Т. 77. – С. 157-173.

7. Cornelissen J. H. C. et al. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide // Australian journal of Botany. – 2003. – Т. 51. – №. 4. – С. 335-380.

Строение, регуляция и функции катионных каналов, ответственных за выход K^+ из клеток высших растений в условиях стресса

Самохина В. В.^{A*}, Мацкевич В. С.^A, Зуенок С. С.^A, Микша Е. Ч.^A, Красовский М. А.^A, Соколик А. И.^A, Демидчик В. В.^A

^A Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: samokhina@bsu.by

Отток электролитов из тканей является одной из центральных реакций растительного организма на стресс. Он наблюдается практически при любом виде стрессового воздействия как абиотической, так и биотической природы, приводя к потере ключевых электролитов, перестройке метаболизма и в некоторых случаях к гибели клеток и организма. Калий – важнейший электролит, осмотик и регулятор электрических явлений растительной клетки. Растения теряют K^+ при стрессе, что приводит к значительному временному снижению его уровня в клетках. Согласно устоявшемуся мнению, стресс-индуцируемый отток K^+ обусловлен повреждением клеточных мембран. Однако появились данные, показывающие, что отток K^+ при умеренном стрессе является процессом обратимым и опосредуемым не повреждением мембран, а активацией K^+ -каналов наружного выпрямления, кодируемых *Gork*. Это происходит под действием накапливающихся при стрессе активных форм кислорода (АФК). Ранее нами был идентифицирован АФК-чувствительный центр в структуре калиевого канала GORK (Цис-151) и проведена генетическая модификация данного центра – замена аминокислоты мишени АФК – цистеина (Цис) на редоксинертный серин (Сер). В настоящей работе было проведено тестирование выхода K^+ из клеток корня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с помощью радиоактивного трейсера $^{86}Rb^+$. Также была детально проанализирована стрессоустойчивость нокаутов по GORK (*gork1-1*) и растений с GORK, модифицированным по Цис-151 (GORK-C151S), с использованием различных ростовых методик и цифрового фенотипирования. Было показано, что у растений дикого типа выход $^{86}Rb^+$ ускоряется под действием NaCl в 5 раз, под действием $HO^{\bullet}$ в 3 раза, а H_2O_2 в 2,5 раза. Данный показатель резко снижался у нокаутов *gork1-1* и растений, экспрессирующих GORK-C151S. Также у данных линий арабидопсиса отмечалось меньшая степень ингибирования роста корней под действием засоления, АФК, γ -радиации, ионов меди, никеля и алюминия по сравнению с диким типом, т.е. данные

растения приобретали общую стрессоустойчивость к стрессорам, которые вызывают отток K^+ . Экспрессия нативного гена *Gork* увеличивалась в 1,5 и 2,7 раза при выращивании растений на фоне 100 и 200 мМ NaCl, соответственно, и снижалась на 25-30% на фоне 1 мМ H_2O_2 . Таким образом, было установлено, что АФК-регулируемый калиевый канал GORK, обладающий функциональным редокс-активным центром Цис-151, имеет ключевое значение в оттоке K^+ из клеток корня высших растений под действием АФК и стрессовых факторов.

Холодная плазмы атмосферного разряда индуцирует генерацию АФК и модифицирует ростовые процессы у высших растений

**Самохина В. В.^А, Русакович А. А.^А, Мацкевич В. С.^А,
Змитрович И. В.^А, Аксютин А. В.^Б, Логунов К. Т.^Б, Пшибытко Н. Л.^А,
Котов Д. А.^Б, Демидчик В. В.^{А*}**

^А *Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

^{*}*E-mail: dzemidchik@bsu.by*

^Б *Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,
Минск, Беларусь*

Холодная плазма атмосферного разряда представляет собой смесь нейтральных и метастабильных атомов и молекул газа, которая обеспечивает нагрев обрабатываемого объекта до температуры не более 40°C. Обработка плазмой приводит к модификации поверхности, повышая ее адгезионные и гидрофильные свойства. Кроме того, холодная плазма индуцирует образование свободных радикалов и химически активного поверхностного слоя. Плазма ионизирует триpletный кислород воздуха, формируя гидроксильные радикалы в газообразной форме. Весьма актуальным представляется исследование влияния холодной плазмы на функциональное состояние, ростовые и сигнальные процессы высших растений с целью разработки методов повышения их продуктивности и устойчивости. В данной работе использовался экспериментальный комплекс, разработанный Белорусским государственным университетом информатики и радиоэлектроники, генерирующий холодную (21-27°C) плазму диффузного разряда. С использованием метода электронного парамагнитного резонанса со спиновой ловушкой 5,5-диметилпирролин-N-оксид была показана генерация активных форм кислорода, включая гидроксильные радикалы, в растворах, имитирующих биологические среды, при их обработке данной холодной плазмой. Амплитуда ЭПР сигнала, индуцируемого холодной плазмой, линейно возрастала с увеличением времени ее воздействия. В качестве растительных тест-объектов воздействия холодной

плазмы использовались семена и проростки ряда высших растений (*Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.), *Triticum aestivum* L.), выращенные *in vitro* и *in vivo*. Обработка семян и проростков проводилась на расстоянии стримеобразования (25-75 мм), время воздействия составляло 1-5 с. Показано, что обработка семян *Arabidopsis thaliana* L. и *Triticum aestivum* L. холодной плазмой стимулировала ростовые процессы, приводила к увеличению скорости роста корней. В то же время, воздействие холодной плазмы на проростки арабидопсиса и пшеницы подавляло рост корней. Обработка плазмой проростков в течение 3 секунд вызывала увеличение флуоресценции диgidроэтидиума в зоне деления корня на 40% по сравнению с контролем, что свидетельствовало о генерации АФК. Зона всасывания не была чувствительной к плазме. Добавление антиоксидантов (1 мМ тиомочевина и 600 ед. супероксиддисмутазы) снижало уровень флуоресценции диgidроэтидиума в зоне деления корня до уровня контроля, уменьшая токсическое действие плазмы на рост корней. С увеличением времени воздействия холодной плазмы подавление ростовых процессов усиливалось, а увеличение расстояния до обрабатываемого объекта снижало ее ингибирующий эффект.

Работа выполнена в рамках задания «Закономерности воздействия холодной плазмы на процессы клеточной сигнализации у высших растений» ГПНИ «Конвергенция-2025» (№ госрегистрации 20211734).

Влияние никеля и цинка на состав жирных кислот липидов мембран у исключателя *Arabidopsis lyrata* и гипераккумулятора *Arabidopsis halleri*

**Серегин И. В.^А, Иванова Т. В.^А, Воронков А. С.^А,
Кожевникова А. Д.^{А*}, Schat H.^Б**

^А Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия.

^Б Свободный Университет, Амстердам, Нидерланды

*E-mail: ecolab-ipp@yandex.ru

Металл-индуцированный окислительный стресс является одним из неспецифических проявлений токсического действия металлов [Seregin, Kozhevnikova, 2006; Kaur, Garg, 2021]. Никель (Ni) и цинк (Zn) не относятся к редокс-активным элементам. Они непосредственно не вызывают образование активных форм кислорода (АФК), и окислительный стресс в этом случае может быть следствием влияния металлов на различные метаболические пути и/или транспорт электронов [Shahzad et al., 2018; Kaur, Garg, 2021]. Мембраны растений являются первыми мишенями для действия металлов, в том числе за счет проявления металл-индуцированного

окислительного стресса [Hall et al., 2002]. В результате металл-индуцированного накопления АФК и увеличения пероксидазной активности ненасыщенные жирные кислоты (ЖК) мембран могут подвергаться перекисному окислению. Это приводит к многочисленным «каскадным» реакциям, приводящим к повреждению мембран, потере их целостности, и, как следствие – к увеличению их проницаемости для ионов [Upchurch, 2008; Zemanova et al., 2015]. В работе впервые проведены сравнительные исследования по изучению металл-индуцированных изменений профиля ЖК у исключателя *Arabidopsis lyrata*, накапливающего Ni и Zn преимущественно в корнях, и гипераккумулятора Zn *Arabidopsis halleri*, накапливающего Zn преимущественно в побегах, а Ni – в корнях. Анализ профиля ЖК в корнях и побегах этих видов был проведен методом ГЖХ-МС [Voronkov et al., 2020], анализ содержания металлов – методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии [Kozhevnikova et al., 2017]. Уровень перекисного окисления липидов определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА) по стандартной методике [Szopiński et al., 2019] с незначительными изменениями.

Содержание Zn в корнях и побегах обоих видов увеличивалось с увеличением концентрации металла в растворе. Содержание Zn в побегах *A. halleri* было существенно выше, чем у *A. lyrata*, тогда как в корнях наблюдалась обратная закономерность в контроле и при 5 мкМ Zn, а при 50 мкМ Zn достоверных различий между двумя видами обнаружено не было. В контроле и при 5 мкМ Zn у гипераккумулятора *A. halleri* содержание Zn в побегах было выше, чем в корнях, при 50 мкМ содержание Zn в корнях и побегах было сходным. При наибольшей концентрации Zn (500 мкМ), так же как и у исключателя *A. lyrata* при всех изученных концентрациях, содержание Zn было выше в корнях, чем в побегах. С увеличением концентрации Zn в растворе значения фактора транслокации постепенно снижались у *A. halleri*, тогда как у *A. lyrata* значения фактора транслокации существенно не изменялись. Значения фактора транслокации у *A. halleri* было во много раз выше по сравнению с *A. lyrata*, в особенности в контроле и при 5 мкМ Zn. Суммарное поглощение Zn увеличивалось с увеличением концентрации металла в растворе у обоих видов и было достоверно выше у *A. halleri* по сравнению с *A. lyrata*.

Содержание Ni в корнях и побегах обоих видов увеличивалось с увеличением концентрации металла в растворе. При обеих концентрациях Ni в растворе (5 и 50 мкМ), содержание Ni в корнях достоверно не различалось у обоих видов. Содержание Ni в побегах было выше у *A. halleri*, чем у *A. lyrata* при 5 мкМ Ni, но ниже у *A. halleri* при 50 мкМ Ni. При обеих концентрациях Ni в растворе (5 и 50 мкМ) содержание Ni в корнях у

A. halleri и *A. lyrata* было выше, чем в побегах. Значения фактора транслокации у растений двух видов достоверно не различались при обеих концентрациях Ni в среде. Суммарное поглощение Ni увеличивалось с увеличением концентрации Ni в растворе у обоих видов и было достоверно выше у *A. lyrata* по сравнению с *A. halleri* только при 50 мкМ Ni.

Содержание МДА в корнях не отличалось от контроля у обоих видов при 5 мкМ Zn или Ni, тогда как при более высоких концентрациях наблюдалось достоверное увеличение содержания МДА у обоих видов. В побегах *A. halleri* увеличение содержания МДА наблюдалось при обеих концентрациях Ni в растворе, а в случае Zn – только при 500 мкМ, в то время как в побегах *A. lyrata* это наблюдалось при обеих концентрациях Zn, а также при 50 мкМ Ni. При эквимоллярных концентрациях металлов в среде влияние Ni на содержание МДА в корнях и побегах *A. halleri* было более сильным по сравнению с Zn, в то время как у *A. lyrata* прослеживалась обратная закономерность.

В составе липидов, выделенных из корней контрольных растений *A. halleri*, обнаружено 24 индивидуальных ЖК, среди которых главными были пальмитиновая (16:0), линолевая (9,12-18:2) и линоленовая (9,12,15-18:3) кислоты. У *A. lyrata* было обнаружено только 16 ЖК, около 60% от суммарного содержания которых приходилось суммарно на 16:0 и 9,12-18:2 и примерно 19% – суммарно на стеариновую (18:0) и 9,12,15-18:3 кислоты. Суммарное относительное содержание ЖК с очень длинной цепью (ЖКОДЦ) в корнях *A. halleri* было незначительно, но недостоверно выше, чем у *A. lyrata*. У исключателя ЖКОДЦ были представлены только 3 видами насыщенных ЖК, тогда как у гипераккумулятора – 10 видами как насыщенных, так и ненасыщенных ЖК, что согласуется со значением индекса ненасыщенности (ИН), который для ЖК липидов корней *A. halleri* был почти в 1.4 раза выше, чем у *A. lyrata*. Доля моноеновых ЖК была выше у *A. lyrata*, в то время как доля диеновых ЖК была незначительно выше у *A. halleri*. Доля триеновых ЖК была в два раза больше у *A. halleri* по сравнению с *A. lyrata*.

Как и в корнях, в побегах *A. halleri* был обнаружен более разнообразный состав ЖК по сравнению с *A. lyrata*. Из 23 индивидуальных ЖК у *A. halleri* преобладали 16:0, ругановая (7,10,13-16:3), 9,12-18:2 и 9,12,15-18:3 кислоты, которые составляли 88% от суммарного содержания ЖК. У *A. lyrata* было обнаружено 19 индивидуальных ЖК, причем 77% от их суммарного содержания приходилось суммарно на 16:0 и 9,12-18:2 и 9,12,15-18:3 и около 13% – на 7,10,13-16:3, 18:0 и олеиновую (9-18:1) кислоты. Суммарное относительное содержание ЖКОДЦ в побегах было значительно ниже, чем в корнях у обоих видов, и в побегах незначительно, но недостоверно ниже у *A. halleri* по сравнению с *A. lyrata*. В отличие от

корней, где у *A. halleri* наблюдалось преобладание лигноцериновой (24:0) кислоты, в побегах все ЖКОДЦ были представлены примерно в равном соотношении от общего содержания ЖК. Также как и в корнях, доля насыщенных ЖК в побегах *A. halleri* была ниже, чем у *A. lyrata*. Доля моноеновых ЖК была незначительно выше у *A. lyrata*. Доля диеновых ЖК у обоих видов практически не различалась, а триеновых ЖК у гипераккумулятора было в 1.5 раза выше по сравнению с исключением. Это согласуется с более высоким показателем ИН у *A. halleri*.

В корнях *A. halleri* при действии Zn значительно снижалось относительное содержание 9,12,15-18:3 и 7,10,13-16:3, что сопровождалось снижением ИН при 500 мкМ Zn. Среди минорных ЖК только при высокой концентрации Zn наблюдалось достоверное незначительное увеличение относительного содержания пальмитолеиновой (9-16:1) и *цис*-вакценовой (11-18:1) кислот, а также появление гептадеценовой (10-17:1) кислоты. При всех изученных концентрациях Zn (5, 50 и 500 мкМ) отмечено появление в корнях следовых количеств лауриновой (12:0) и тридекановой (13:0) кислот. Достоверного изменения относительного содержания в корнях других ЖК при действии Zn найдено не было. Суммарное относительное содержание ЖКОДЦ возрастало при 500 мкМ Zn. Только при высокой концентрации Zn в растворе наблюдалось снижение доли триеновых ЖК, преимущественно за счет снижения содержания 9,12,15-18:3, в то время как доля моноеновых кислот незначительно возрастала.

В то время как в корнях у контрольных растений *A. lyrata* было выявлено 16 видов индивидуальных ЖК, то при действии 5 и 50 мкМ Zn число видов индивидуальных ЖК увеличивалось до 24 и 20, соответственно. Только при действии Zn в незначительных количествах были идентифицированы насыщенные ЖК: нонадекановая (19:0), генэйкозановая (21:0), трикозановая (23:0) и церотиновая (26:0), а также ненасыщенные ЖК: *цис*-14-гексадекановая (14-16:1), 7,10-гексадекадиеновая (7,10-16:2), 7,10,13-16:3, гондоиновая (11-20:1) и нервоновая (15-24:1). Все перечисленные ЖК, за исключением 14-16:1, были обнаружены в корнях контрольных растений *A. halleri*. При обеих концентрациях Zn в корнях *A. lyrata* наблюдалось снижение относительного содержания 18:0, а при концентрации 5 мкМ Zn – также 16:0. При 50 мкМ Zn относительное содержание 9-16:1 возрастало. Суммарное относительное содержание ЖКОДЦ возрастало при 5 мкМ Zn и снижалось при 50 мкМ Zn по сравнению с контролем. При 50 мкМ Zn прослеживалось незначительное увеличение доли триеновых ЖК. В целом в липидах из корней *A. lyrata* наблюдалось значительное снижение доли насыщенных ЖК, что сопровождалось увеличением ИН.

В побегах *A. halleri* при увеличении концентрации Zn в растворе уменьшалось относительное содержание полиненасыщенных кислот: 7,10,13-16:3 и 9,12,15-18:3. При этом относительное содержание 16:0 (при 5-500 мкМ Zn), 24:0 и 9,12-18:2 (при 50 и 500 мкМ Zn), а также 9-18:1, пентадекановой (15:0) и 18:0 кислот (при 500 мкМ Zn) увеличивалось. Представляет интерес, что только в побегах опытных растений *A. halleri* была идентифицирована редкая α -паринаровая кислота (9,11,13,15-18:4), содержание которой возрастало с увеличением концентрации Zn. Суммарное относительное содержание ЖКОДЦ возрастало при действии Zn примерно в 2 раза по сравнению с контролем, что объясняется не только суммированием незначительного увеличения относительного содержания отдельных видов индивидуальных ЖКОДЦ, но и появлением 11-20:1, которая отсутствует у контрольных растений. В целом при действии Zn в побегах *A. halleri* наблюдалось значительное возрастание доли насыщенных ЖК и снижение доли триеновых ЖК, с чем связано снижение ИН при увеличении концентрации Zn в среде.

В побегах *A. lyrata*, в отличие от *A. halleri*, при действии Zn не было найдено значительных изменений в профиле ЖК, что согласуется с отсутствием достоверного изменения ИН. Наблюдалось только небольшое увеличение относительного содержания 9,12-18:2 и 11-18:1 при 50 мкМ Zn, а также 9-18:1 при обеих концентрациях Zn. При 50 мкМ Zn среди ЖКОДЦ наблюдалось появление 15-24:1 и увеличение по сравнению с контролем относительного содержания *цис,цис*-11,14-экозадиеновой (11,14-20:2) кислоты, что сопровождалось увеличением суммарного содержания ЖКОДЦ. Доля насыщенных, моноеновых и триеновых ЖК значительно не изменялась при действии Zn в корнях, тогда как доля диеновых ЖК незначительно увеличивалась при 50 мкМ Zn.

При действии Ni в корнях *A. halleri* число видов индивидуальных ЖК уменьшалось с 24 до 21, хотя качественный состав ЖК незначительно различался при действии 5 и 50 мкМ Ni по сравнению с контролем. Среди главных ЖК возрастало относительное содержание 9,12-18:2 при 5 мкМ Ni, а при 50 мкМ Ni наблюдалось увеличение относительного содержания 9-18:1, которая из минорных переходила в разряд главных ЖК. При 50 мкМ Ni наблюдалось также увеличение относительного содержания 11-18:1. При обеих концентрациях Ni отмечалось снижение видового разнообразия ЖКОДЦ и их суммарного относительного содержания по сравнению с контролем, хотя достоверно только при 50 мкМ Ni, тогда как относительное содержание арахидовой (20:0) и 11-20:1 кислот при 50 мкМ Ni возрастало. Следствием этих изменений является увеличение доли моноеновых ЖК при 50 мкМ Ni с незначительным снижением доли насыщенных ЖК. Доля диеновых ЖК при 5 мкМ Ni увеличивалась, тогда как

триеновых ЖК – снижалась. Однако значения ИН при этом достоверно не изменялись.

В корнях *A. lyrata* в отличие от контрольных растений, при действии Ni были идентифицированы 12:0, 7,10-16:2, 7,10,13-16:3, а также ряд ЖКОДЦ, в результате чего число видов индивидуальных ЖК увеличилось с 16 у контрольных растений до 26 при 5 мкМ Ni или 27 при 50 мкМ Ni. Среди главных ЖК при обеих концентрациях Ni уменьшалось относительное содержание 18:0, только при 5 мкМ Ni увеличивалось относительное содержание 9,12,15-18:3, а при 50 мкМ Ni – 9-18:1 и 9,12-18:2, в то время как содержание 16:0 ЖК при этой концентрации снижалось. Только при высокой концентрации Ni происходило снижение относительного содержания минорных ЖК: миристиновой (14:0), 15:0 и 7-гексадекановой (7-16:1), а также увеличение относительного содержания 9-16:1. Суммарное относительное содержание ЖКОДЦ незначительно, но недостоверно, возрастало с увеличением концентрации Ni в среде за счет появления новых видов ЖКОДЦ: 11-20:1, 11,14-20:2, 21:0, 23:0, 15-24:1, пентакоциловой (25:0) и 26:0 кислот. В целом при обеих концентрациях доля насыщенных ЖК снижалась, а ненасыщенных ЖК возрастала, в наибольшей степени при 50 мкМ, что согласуется с увеличением значения ИН.

В побегах *A. halleri* при действии Ni качественный состав ЖК практически не менялся, за исключением нескольких минорных и следовых кислот. При обеих концентрациях Ni наблюдалось увеличение относительного содержания 16:0, 9-18:1 и 9,12-18:2 и снижение содержания 7,10,13-16:3 и 9,12,15-18:3. Как и при действии Zn, только в побегах *A. halleri* при 5 мкМ Ni была идентифицирована необычная 9,11,13,15-18:4. Однако при более высокой концентрации Ni, в отличие от Zn, эта ЖК не выявлялась. Состав ЖКОДЦ в присутствии Ni значительно не менялся по сравнению с контролем, в то время как их суммарное относительное содержание незначительно, но не достоверно, увеличивалось за счет появления 11-20:1, достоверного увеличения содержания 24:0 и небольшого увеличения содержания некоторых других ЖКОДЦ. Как следствие вышеперечисленных Ni-индуцированных изменений доля насыщенных, моноеновых, и, в меньшей степени, диеновых ЖК увеличивалась, тогда как доля триеновых ЖК существенно снижалась, в результате чего снижалось значение ИН.

В побегах *A. lyrata* в присутствии Ni происходило увеличение числа индивидуальных ЖК, главным образом за счет ЖКОДЦ. Состав главных ЖК при обеих концентрациях Ni не изменялся по сравнению с контрольными растениями, тогда как относительное содержание 16:0 уменьшалось при 5 мкМ Ni, содержание 18:0 уменьшалось при 5 и 50 мкМ Ni, а содержание 7,10,13-16:3 и в значительной степени 9-18:1 увеличивалось при

5 и 50 мкМ, соответственно. Кроме того, в присутствии Ni снижалось относительное содержание минорных ЖК: 14:0, 15:0, 7-16:1 и 11-18:1. Суммарное относительное содержание ЖКОДЦ незначительно, но недостоверно изменялось по сравнению с контрольными растениями. В отличие от *A. halleri*, доля насыщенных ЖК в побегах *A. lyrata* уменьшалась по сравнению с контролем, а ненасыщенных ЖК, главным образом триеновых при 5 мкМ Ni и моноеновых при 50 мкМ Ni, возрастала. Эти изменения сопровождались незначительным увеличением значения ИН при 5 мкМ Ni. При низкой концентрации Ni значительных отличий в соотношении насыщенных и триеновых ЖК, а также в значении ИН у *A. halleri* и *A. lyrata* не наблюдалось, несмотря на существенные отличия, выявленные в побегах контрольных растений двух видов.

Таким образом, наиболее существенные изменения в составе ЖК наблюдались в побегах гипераккумулятора и в корнях исключателя и эти изменения были металло- и видоспецифичными. В побегах *A. halleri* наблюдалось увеличение содержания насыщенных ЖК и снижение содержания ненасыщенных ЖК, тогда как в корнях *A. lyrata* прослеживалась обратная закономерность. Наблюдаемые металл-индуцированные изменения состава ЖК в побегах *A. halleri* могут приводить к снижению текучести мембран, в результате чего снижается проникновение в мембрану активных форм кислорода, что поддерживает ее стабильность. Более разнообразный качественный состав ЖК у гипераккумулятора по сравнению с исключателем, а также способность растений подстраивать текучесть мембран посредством изменения уровня ненасыщенности ЖК может быть одной из причин высокой способности гипераккумулятора адаптироваться к металл-индуцированному стрессу, что более подробно обсуждается в статье [Seregin et al., 2023].

Работа частично поддержана Министерством науки и образования РФ (№122042700044-6) и грантом РНФ № 21-14-00028.

Библиографические ссылки

1. Hall, J.Á. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. *J. Exp. Bot.* 2002, 53, 1–11, doi:10.1093/jexbot/53.366.1.
2. Kaur, H.; Garg, N. Zinc Toxicity in Plants: A Review. *Planta* 2021, 253, 129, doi:10.1007/s00425-021-03642-z.
3. Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I.V.; Gosti, F.; Schat, H. Zinc Accumulation and Distribution Over Tissues in *Noccaea caerulea* in Nature and in Hydroponics: A Comparison. *Plant Soil* 2017, 411, 5–16, doi:10.1007/s11104-016-3116-6.
4. Seregin, I. V.; Ivanova, T. V.; Voronkov, A. S.; Kozhevnikova, A. D.; Schat, H. Zinc- and Nickel-Induced Changes in Fatty Acid Profiles in the Zinc Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and Non-Accumulator *Arabidopsis lyrata*. *Plant Physiol. Biochem.* 2023, 197, 107640, doi:10.1016/j.plaphy.2023.107640.

5. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Physiological Role of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2006, 53, 257–277, doi:10.1134/S1021443706020178.
6. Shahzad, B.; Tanveer, M.; Rehman, A.; Cheema, S.A.; Fahad, S.; Rehman, S.; Sharma, A. Nickel; Whether Toxic or Essential for Plants and Environment - A Review. *Plant Physiol. Biochem.* 2018, 132, 641–651, doi:10.1016/j.plaphy.2018.10.014.
7. Szopiński, M.; Sitko, K.; Gieroń, Ż.; Rusinowski, S.; Corso, M.; Hermans, C.; Verbruggen, N.; Małkowski E. Toxic Effects of Cd and Zn on the Photosynthetic Apparatus of the *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa* Pseudometallophytes. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 748, doi:10.3389/fpls.2019.00748.
8. Upchurch, R.G. Fatty Acid Unsaturation, Mobilization, and Regulation in the Response of Plants to Stress. *Biotechnol. Lett.* 2008, 30, 967–977, doi: 10.1007/s10529-008-9639-z.
9. Voronkov, A.; Ivanova, T.; Kumachova, T. Micromorphological and Biochemical Features of Malus Fruit: *Malus domestica* Borkh. and its Parent Species – *Malus orientalis* Uglitzk. *Rev. Bras. Bot.* 2020, 43, 21–28, doi:10.1007/s40415-020-00578-8.
10. Zemanová, V.; Pavlík, M.; Kyjaková, P.; Pavlíková, D. Fatty Acid Profiles of Ecotypes of Hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* Growing Under Cadmium Stress. *J. Plant Physiol.* 2015, 180, 27–34, doi:10.1016/j.jplph.2015.02.012.

Роль низкомолекулярных лигандов в транспорте и детоксикации металлов у растений

Серегин И. В.^{A*}, Кожевникова А. Д.^A

^A *Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия.*

*E-mail: ecolab-ipp@yandex.ru

Минеральное питание играет важную роль в жизни растений и в значительной степени определяет их продуктивность. С одной стороны, дефицит питательных элементов является лимитирующим фактором, снижающим продуктивность сельскохозяйственных культур, а также широко распространенной причиной, вызывающей заболевания человека. С другой стороны, поступление металлов в окружающую среду в результате хозяйственной деятельности человека в последние десятилетия постоянно возрастает, что приводит к повышению содержания ряда металлов в растениях и проявлению токсического действия металлов на различные физиологические процессы. Множественное токсическое действие металлов проявляется в ингибировании активности ферментов, образовании активных форм кислорода, в результате чего возникает металл-индуцированный окислительный стресс, в изменении водного режима, проницаемости мембран и поглощения катионов и анионов, а также в снижении интенсивности дыхания и фотосинтеза [обобщено в Seregin, Ivanov, 2001; Seregin, Kozhevnikova, 2006; Kaur, Garg, 2021], что в конечном итоге выражается в нарушении роста и морфогенеза [обобщено в Ivanov,

Zhukovskaya, 2021]. В отличие от органических соединений, которые могут разлагаться микроорганизмами, металлы и металлоиды фактически не разлагаются, а следовательно, накапливаются в окружающей среде и поглощаются растениями, которые являются основным источником их поступления в пищевые цепи и в организм человека.

По существующей классификации выделяют две контрастные группы растений: исключатели, у которых металлы накапливаются главным образом в корневой системе, и (гипер-)аккумуляторы, у которых они накапливаются преимущественно в надземных органах. В настоящее время известно около 720 видов гипераккумуляторов [Manara et al., 2020], которые привлекают все большее внимание биологов, геохимиков и экологов. Изучение морфофизиологических особенностей растений, определяющих их способность избирательно накапливать металлы в корнях или побегах, имеет большое фундаментальное значение для физиологии растений, токсикологии и иономики.

Способность к накоплению металлов неоднократно возникала у растений в процессе эволюции [Krämer, 2010]. Растения разных видов и экотипов могут существенно различаться по способности накапливать металлы и по устойчивости к их токсическому действию, что может быть связано с их эволюцией на разных типах почв [Kozhevnikova et al., 2020]. Устойчивость к металлам и способность к гипераккумуляции находятся под независимым генетическим контролем, а гены, их определяющие, не являются видоспецифичными, а скорее по-разному экспрессируются у гипераккумуляторов и исключателей. Высокая устойчивость и способность к гипераккумуляции определяются высокой эффективностью механизмов детоксикации металлов, направленных на поддержание гомеостаза. Механизмы гипераккумуляции потенциально могут контролироваться на четырех уровнях: (1) на уровне поглощения металлов из почвы корневыми системами растений, (2) на уровне радиального транспорта металлов в корнях, а также (3) на уровне их транспорта в надземные органы по ксилеме и (4) накопления в листьях в нетоксичной форме. Важнейшая роль в механизмах поглощения, транспорта и детоксикации металлов принадлежит низкомолекулярным лигандам – ключевым игрокам, участвующим в поддержании гомеостаза металлов и в механизмах, определяющих феномен гипераккумуляции [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021]. К важнейшим низкомолекулярным металл-связывающим лигандам относятся гистидин, никотианамин, фитохелатины и органические кислоты. Сродство ионов металлов к лигандам определяется константами стабильности образующихся комплексов, обычно уменьшается в ряду никотианамин > гистидин > органические кислоты и, кроме того, зависит от pH. Количество разных лигандов в клетках разных тканей и органов может различаться.

Кроме того, оно может значительно меняться при действии металлов. Поэтому очевидно, что в клетке имеет место конкуренция между разными лигандами за связывание ионов металлов, а также между разными металлами за связывание с одним лигандом. Основная функция металл-связывающих лигандов заключается в поддержании лабильного пула металлов [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021, 2023a,б].

Содержание свободного гистидина в корнях гипераккумуляторов *Nocca caerulea* и *Odontarrhena serpyllifolia* было значительно выше, чем у близкородственных исключателей *Thlaspi arvense* и *Alyssum montanum* [Ingle et al., 2005; Richau et al., 2009]. Однако, несмотря на различия в способности накапливать металлы и устойчивости к ним, растения разных экотипов гипераккумулятора никеля (Ni), цинка (Zn) и кадмия (Cd) *N. caerulea* не различались по эндогенному содержанию гистидина в корнях и побегах, что свидетельствует о том, что повышенный уровень гистидина в корнях *N. caerulea* не определяет внутривидовые отличия в способности растений разных экотипов накапливать металлы [Richau et al., 2009].

Гистидин, наряду с другими аминокислотами, а также органическими кислотами и другими веществами, входит в состав корневых экссудатов [Panchal et al., 2021]. Экзогенный гистидин может поглощаться из окружающей среды корневыми системами как исключателей (*Thlaspi arvense*), так и гипераккумуляторов (*N. caerulea*). В поглощении гистидина клетками ризодермы, возможно, играют важную роль LHT1 (Lysine Histidine Transporter 1) и APP1 (Amino Acid Permease 1) [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021]. Предобработка экзогенным L-гистидином приводила к увеличению концентрации Ni и Zn в пасоке как у некоторых исключателей, так и у некоторых гипераккумуляторов, но не приводила к увеличению концентрации Cd в ксилемном соке у исключателя *T. arvense* и гипераккумулятора *N. caerulea*, что является отражением низкого сродства гистидина к ионам Cd. В отличие от гистидина, предобработка растений глутамином, аспарагином, а также аланином не приводила к увеличению концентрации Ni или Zn в пасоке или увеличению их загрузки в сосуды ксилемы. Следовательно, эффект гистидина уникален, а не является общим свойством аминокислот [Richau et al., 2009; Kozhevnikova et al., 2014a,b, 2021; Seregin et al., 2019, 2022; Soleymanifar et al., 2024]. Гистидин снижал проявление токсического действия Ni у гипераккумулятора Ni *Odontarrhena inflata* и исключателя *Aurinia saxatilis* благодаря индукции активности антиоксидантных ферментов, в частности, пероксидазы [Soleymanifar et al., 2024].

Эффективность поступления комплексов Ni или Zn с гистидином в выделенные из корней везикулы тонопласта выше у исключателя

T. arvense по сравнению с гипераккумулятором *N. caerulescens* [Richau et al., 2009; Kozhevnikova et al., 2014b]. Связывание металлов с гистидином в цитозоле ограничивает поступление металлов в вакуоли клеток коры корня, облегчая их поступление в ксилему у гипераккумуляторов, тогда как у исключателей Ni и Zn накапливаются в клетках коры, что подтверждается данными гистохимического и количественного анализа металлов. Так как гистидин имеет высокую константу стабильности комплекса с Ni и Zn при pH цитозоля, можно предположить, что эти комплексы образуются при поступлении ионов металлов в цитозоль. Комплекс поступает в вакуоль с помощью неидентифицированного транспортера. Благодаря более низкому значению pH вакуолярного сока (pH 5.0-6.2) по сравнению с цитозолем (pH 7.2-7.5), азот имидазольного кольца протонируется и комплекс разрушается, а металл связывается с более слабыми лигандами, например, с органическими кислотами [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021].

Никотианамин – низкомолекулярный N-содержащий металл-связывающий лиганд, количество которого меняется в зависимости от недостатка или избытка металлов, которые имеют к нему высокое сродство. Хотя синтез никотианамина может индуцироваться *in vivo* различными металлами, эта непротеиногенная аминокислота участвует в детоксикации главным образом Zn, Ni, железа (Fe), меди (Cu) и марганца (Mn). В клетках растений осуществляется двухстадийный синтез никотианамина из L-метионина при участии S-аденозилметионин синтетазы и никотианамин синтазы (NAS). У злаков, а также у гипераккумулятора Zn и Cd *Arabidopsis halleri* никотианамин может секретироваться в ризосферу, в чем, вероятно, может принимать участие транспортер ENA1 (Efflux transporter of NA1). У злаков образующиеся в ризосфере комплексы никотианамина с металлами могут поглощаться корнями растений с участием транспортеров YSL (Yellow-Stripe Like). Комплексы никотианамина с металлами образуются также в цитозоле клеток ризодермы и коры и транспортируются по направлению к проводящим тканям, что ограничивает поступление металлов в вакуоли клеток корня и является одним из механизмов гипераккумуляции. Никотианамин может транспортироваться через тонопласт с участием транспортера ZIF1 (Zinc Induced Facilitator 1) и отчасти участвовать в связывании металлов в вакуоли, хотя стабильность комплексов никотианамина с металлами при pH вакуолярного сока низка. Никотианамин вносит вклад в дальний транспорт металлов. При участии транспортеров NAET1/2 (NA Efflux Transporter1/2) никотианамин поступает в секреторные везикулы, а затем посредством экзоцитоза – в апопласт, где формируются комплексы с металлами, поступающие во флоэму с участием транспортеров YSL. Благодаря более высоким значениям pH,

стабильность этих комплексов во флоэмном соке выше, чем в ксилемном соке, что обеспечивает участие никотианамина главным образом в дальнейшем транспорте металлов по флоэме. Гидроксилирование никотианамина, наблюдающееся у некоторых видов растений, может увеличивать стабильность комплексов металла с лигандом в кислой среде. Содержание никотианамина в корнях ряда гипераккумуляторов выше, чем у исключателей, что определяется более высоким уровнем экспрессии генов *NAS* у первых и свидетельствует о важной роли никотианамина в поддержании гомеостаза металлов и механизмах гипераккумуляции [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021, 2023a].

Фитохелатины – небольшие богатые цистеином пептиды, способные связывать ионы металлов через SH-группы. Хотя синтез фитохелатинов может индуцироваться *in vivo* различными металлами, они участвуют в детоксикации и транспорте по флоэме главным образом Cd и металлоида мышьяка (III) (As), а также, в меньшей степени, Zn, Cu, ртути (Hg) и свинца (Pb), ионы которых обладают высоким сродством к S-содержащим лигандам. Синтез фитохелатинов осуществляется при участии фитохелатинсинтазы в цитозоле. Активность этого фермента возрастает в присутствии ионов металлов, что определяется наличием специфических для определенных металлов аминокислотных последовательностей в C-терминальном домене белка. У некоторых видов растений обнаружены изофитохелатины, отличающиеся C-терминальным аминокислотным остатком. Фитохелатинсинтаза кодируется генами *PCS*, уровень экспрессии которых может меняться при действии металлов. В цитозоле ионы металлов связываются с фитохелатинами с образованием различных комплексов, отличающихся по структуре и степени полимеризации фитохелатинов. АТФ-зависимый транспорт низкомолекулярных комплексов металлов с фитохелатинами через тонопласт осуществляется с помощью транспортеров ABC1/2/3 (ATP-Binding Cassette subfamily C). В вакуоли при участии кислото-лабильного сульфида (S^{2-}), предположительно поступающего из хлоропластов, могут образовываться высокомолекулярные комплексы металлов с фитохелатинами. Благодаря кислому значению pH вакуолярного сока, вероятно, частично эти комплексы могут разрушаться, а ионы металлов связываются с органическими кислотами. Содержание фитохелатинов в корнях и побегах гипераккумуляторов находится на низком уровне, что свидетельствует об отсутствии их участия в механизмах гипераккумуляции, но не исключает определенного их вклада в детоксикацию и транспорт металлов у этих видов растений [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021, 2023b].

Органические кислоты также играют важную роль в механизмах детоксикации и транспорта металлов, но не в механизмах гипераккумуляции. В клетке основным местом образования органических кислот являются митохондрии и глиоксисомы, где протекают реакции цикла Кребса и глиоксилатного цикла, соответственно. Транспорт органических кислот через внутреннюю мембрану митохондрий осуществляется по обменному механизму при участии переносчиков, таких как DICs (Dicarboxylate Carriers), DTC (Dicarboxylate/Tricarboxylate Carrier), SFC (Succinate/Fumarate Carrier).

Секреция малата корнями растений осуществляется с помощью ALMT1 (Aluminum-activated Malate Transporter 1), а секреция цитрата – с помощью транспортеров семейства MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion), которые расположены на плазмалемме клеток ризодермы. В ризосфере происходит связывание органических кислот с ионами металлов с образованием комплексов различной структуры, что влияет на поступление металлов в растение. Ионы алюминия (Al^{3+}), находящиеся в клеточных оболочках клеток ризодермы, могут связываться с малатом, поступившим туда с помощью ALMT1, а затем образующиеся комплексы транспортируются через плазмалемму в цитозоль при участии NIP1;2 (Nodulin 26-like Intrinsic Protein).

Поступление ионов металлов в вакуоль осуществляется с помощью различных вакуолярных транспортеров, а транспорт органических кислот через тонопласт, например, с помощью tDT (tonoplast Dicarboxylate Transporter). У *Arabidopsis thaliana* показано участие в транспорте органических кислот через тонопласт также транспортеров ALMT4 и ALMT6, экспрессия генов которых показана в замыкающих клетках устьиц, а ALMT4 также в мезофилле листа. Транспорт металлов в вакуоль и их дальнейшее связывание с органическими кислотами является одним из важнейших механизмов детоксикации металлов.

Дальний транспорт металлов из корней в побеги по ксилеме в значительной степени осуществляется в виде комплексов с органическими кислотами. Поступление цитрата в сосуды ксилемы осуществляется с помощью расположенного на плазмалемме клеток центрального цилиндра транспортера FRD3 (Ferric chelate Reductase Defective 3), а также других представителей MATE семейства.

Несмотря на то, что гипераккумуляторы конститутивно содержат большое количество органических кислот, они участвуют в большей степени в детоксикации металлов, а не в механизмах гипераккумуляции, что определяется более низкой стабильностью их комплексов с металлами по сравнению с другими металл-связывающими лигандами [обобщено в Panchal et al., 2021; Seregin, Kozhevnikova, 2021].

Высокое содержание металлов в окружающей среде на заре становления жизни могло способствовать формированию механизмов их детоксикации уже на ранних этапах эволюции. Об этом свидетельствует функциональное сходство фитохелатинсинтаз растений и цианобактерий, которые, однако, не содержат С-терминального домена [Hirata et al., 2005; Rea, 2012], присутствие никотианамин-подобных металлофоров у бактерий, а также генов *NAS* у бактерий, архей и грибов [Laffont, Arnoux, 2020]. Дальнейшее изучение низкомолекулярных металл-связывающих лигандов позволит не только полнее понять фундаментальные механизмы поглощения, транспорта и детоксикации металлов, направленные на поддержание гомеостаза, но и разработать новые подходы, использующиеся в технологиях биообогащения, фиторемедиации, фитомайнинга, а также мониторинга загрязнения окружающей среды металлами.

Работа поддержана Министерством науки и образования РФ (№122042700044-6).

Библиографические ссылки

1. Hirata, K.; Tsuji, N.; Miyamoto, K. Biosynthetic Regulation of Phytochelatins, Heavy Metal-Binding Peptides. *J. Biosci. Bioeng.* 2005, 100, 593–599, doi:10.1263/jbb.100.593.
2. Ingle, R.A.; Mugford, S.T.; Rees, J.D.; Campbell, M.M.; Smith, J.A.C. Constitutively High Expression of the Histidine Biosynthetic Pathway Contributes to Nickel Tolerance in Hyperaccumulator Plants. *Plant Cell* 2005, 17, 2089–2106, doi:10.1105/tpc.104.030577.
3. Ivanov, V.B.; Zhukovskaya, N.V. Effect of Heavy Metals on Root Growth and the Use of Roots as Test Objects. *Russ. J. Plant Physiol.* 2021, 68, S1–S25, doi:10.1134/S1021443721070049.
4. Kaur, H.; Garg, N. Zinc Toxicity in Plants: A Review. *Planta* 2021, 253, 129, doi:10.1007/s00425-021-03642-z.
5. Kozhevnikova A.D.; Seregin I.V.; Verweij R.; Schat H. Histidine Promotes the Loading of Nickel and Zinc, but not of Cadmium, into the Xylem in *Noccaea caerulescens* // *Plant Signal. Behav.* 2014a, 9, e29580, doi:10.4161/psb.29580.
6. Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I. V.; Aarts, M.G.M.; Schat, H. Intra-Specific Variation in Zinc, Cadmium and Nickel Hypertolerance and Hyperaccumulation Capacities in *Noccaea caerulescens*. *Plant Soil* 2020, 452, 479–498, doi:10.1007/s11104-020-04572-7.
7. Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I.V.; Erlikh, N.T.; Shevyreva, T.A.; Andreev, I.M.; Verweij, R.; Schat, H. Histidine-Mediated Xylem Loading of Zinc Is a Species-Wide Character in *Noccaea caerulescens*. *New Phytol.* 2014b, 203, 508–519, doi:10.1111/nph.12816.
8. Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I.V.; Schat, H. Translocation of Ni and Zn in *Odon-tarrhena corsica* and *Noccaea caerulescens*: The Effects of Exogenous Histidine and Ni/Zn Interactions. *Plant Soil* 2021, 468, 295–318, doi:10.1007/s11104-021-05080-y.
9. Krämer, U. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010, 61, 517–534, doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112156.

10. Laffont, C.; Arnoux, P. The Ancient Roots of Nicotianamine: Diversity, Role, Regulation and Evolution of Nicotianamine-like Metallophores. *Metallomics* 2020, 12, 1480–1493, doi:10.1039/d0mt00150c.
11. Manara, A.; Fasani, E.; Furini, A.; DalCorso, G. Evolution of the Metal Hyperaccumulation and Hypertolerance Traits. *Plant Cell Environ.* 2020, 43, 2969–2986, doi:10.1111/pce.13821.
12. Panchal, P.; Miller, A.J.; Giri, J. Organic Acids: Versatile Stress-Response Roles in Plants. *J. Exp. Bot.* 2021, 72, 4038–4052, doi:10.1093/jxb/erab019.
13. Rea, P.A. Phytochelatase: of a Protease a Peptide Polymerase Made. *Physiol. Plant.* 2012, 145, 154–164, doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01571.x.
14. Richau, K.H.; Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I.V.; Vooijs, R.; Koevoets, P.L.M.; Smith, J.A.C.; Ivanov, V.B.; Schat, H. Chelation by Histidine Inhibits the Vacuolar Sequestration of Nickel in Roots of the Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 2009, 183, 106–116, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x.
15. Seregin, I.V.; Ivanov, V.B. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2001, 48, 523–544, doi:10.1023/A:1016719901147.
16. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Low-Molecular-Weight Ligands in Plants: Role in Metal Homeostasis and Hyperaccumulation. *Photosynth. Res.* 2021, 150, 51–96, doi:10.1007/s11120-020-00768-1.
17. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Nicotianamine: A Key Player in Metal Homeostasis and Hyperaccumulation in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2023a, 24, 10822, doi:10.3390/ijms241310822.
18. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Physiological Role of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2006, 53, 257–277, doi:10.1134/S1021443706020178.
19. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Phytochelatins: Sulfur-Containing Metal(loid)-Chelating Ligands in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2023b, 24, 2430, doi:10.3390/ijms24032430.
20. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D.; Schat, H. Comparison of L-histidine Effects on Nickel Translocation into the Shoots of Different Species of the Genus *Alyssum*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2019, 66, 340–344, doi:10.1134/S1021443719020122.
21. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D.; Schat, H. Correlated Variation of the Zn Accumulation and Tolerance Capacities among Populations and Ecotypes of the Zn Hyperaccumulator, *Noccaea caerulescens*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2021, 68, S26–S36, doi:10.1134/S1021443721070128.
22. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D.; Schat, H. Nickel Tolerance and Accumulation Capacities in Different Populations of the Hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2022, 69, 70, doi:10.1134/S1021443722040148.
23. Soleymanifar, S.; Ehsanpour, A.A.; Ghasemi, R.; Schat, H. The Effect of L-histidine on Nickel Translocation and the Activities of Antioxidant Enzymes in Hyperaccumulator (*Odontarrhena inflata*) and Non-accumulator (*Aurinia saxatilis*) Plants. *Plant Soil* 2024, 495, 411–428, doi:10.1007/s11104-023-06340-9.

Идентификация конъюгированных диенов жирных кислот у микроводоросли *Vischeria* sp. IPPAS C-70 в условиях окислительного стресса

Сидоров Р. А.^А, Стариков А. Ю.^А, Синетова М. А.^А,
Гюльмисарян Е. В.^А, Лось Д. А.^{А*}

^А Институт физиологии растений им К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия,

*E-mail: losda@ippras.ru

Микроводоросль *Vischeria* sp. известна как продуцент ценной омега-3 эйкозапентаеновой кислоты [1]. Ранее было обнаружено, что в стрессовых условиях и при старении культуры, клетки этой водоросли накапливали необычные жирные C16 кислоты. Для их идентификации был применен комплексный подход с использованием методов Ag-ТСХ, УФ- спектроскопии, ВЭЖХ и ГХ-МС (рис. 1).

Было показано, что двойные связи в этих ЖК являются сопряженными диенами и алленами. Наряду с обычными C16 ЖК (16:2Δ6,9, 16:2Δ7,10 и 16:2Δ9,12), впервые идентифицировано и описано 6 ранее неизвестных природных изомеров диеновых C16 ЖК (16:2Δ6,8, Δ7,9, Δ8,10, Δ9,11 и Δ10,12), а также алленовая ЖК (16:2Δ9,10). На долю этих необычных ЖК приходилось до 28% от суммы ЖК суммарных липидов клеток. Предполагается, что образование сопряженных диенов и алленов ЖК является результатом окислительного стресса, вызванного H₂O₂ [2]. Перекись водорода также вызывала увеличение насыщенных жирных кислот за счет ненасыщенных, что позволяет предположить ингибирование либо активности десатураз ЖК, либо экспрессии соответствующих генов. Конъюгированные и алленовые ЖК проявляют противовоспалительные, антиоксидантные и противовирусные свойства, а также активность против клеток некоторых видов рака.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (РНФ) № 21-74-30003.

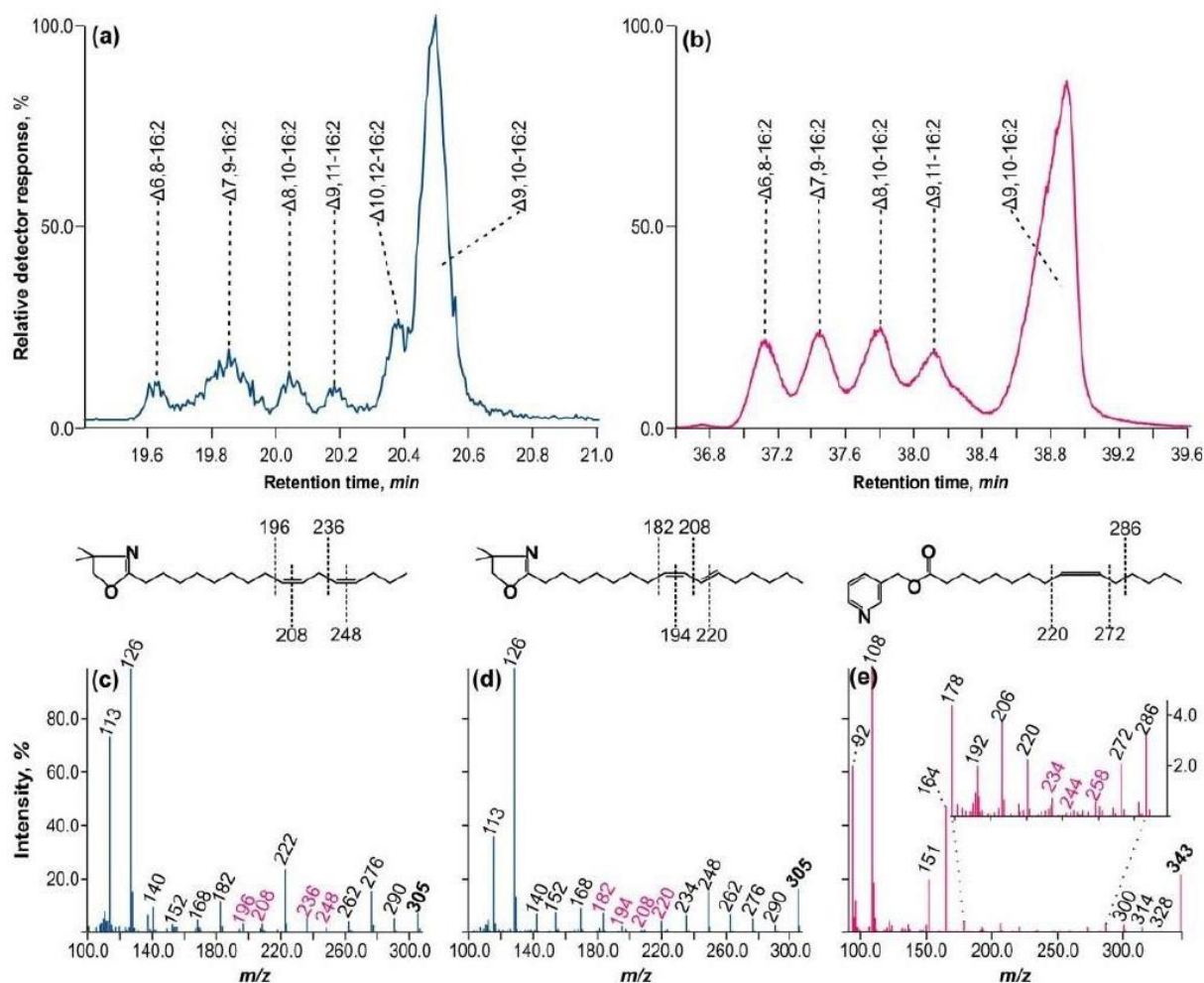


Рис.1. ГХ-МС ионные хроматограммы различных азотосодержащих производных С16 ЖК и масс-спектры их выбранных пиков. (а) Ионная хроматограмма при $m/z=305$ производных ДМОКС сопряженных гексадекадиеновых кислот; (б) Ионная хроматограмма при $m/z=343$ никотиниловых эфиров сопряженных гексадекадиеновых кислот; (в) Масс-спектр ДМОКС $\Delta 9,12-16:2$ (диен с метиленовыми группами); (г) Масс-спектр ДМОКС $\Delta 8,10-16:2$ (сопряженный диен); (д) Масс-спектр никотинил-9,10-гексадекадиеновой кислоты (алленовая конфигурация)

Библиографические ссылки

1. Sinetova M.A., Sidorov R.A., Medvedeva A.A., Starikov A.Y., Markelova A.G., Allakhverdiev S.I., Los D.A. (2021) Effect of salt stress on physiological parameters of microalgae *Vischeria punctata* strain IPPAS H-242, a superproducer of eicosapentaenoic acid. *J. Biotechnol.* 331, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.03.001>
2. Sidorov R.A., Starikov A.Y., Sinetova M.A., Guilmisarian E.V., Los D.A. (2024) Identification of conjugated dienes of fatty acids in *Vischeria* sp. IPPAS C-70 under oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 3239. <https://doi.org/10.3390/ijms25063239>

Эффекты пониженной температуры на про-/антиоксидантный метаболизм и активность фотосинтетического аппарата листьев *Zea mays*

**Силина Е. В.^A, Малышев Р. В.^A, Шелякин М. А.^A,
Табаленкова Г. Н.^A, Головки Т. К.^{A*}**

^A *Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г.Сыктывкар, Россия,*

**E-mail: golovko@ib.komisc.ru*

Кукуруза – ценная сельскохозяйственная культура субтропического происхождения с С4 типом фотосинтеза. Оптимальными для ее роста и развития являются температура 25-28 °С. Известно, что низкие положительные температуры индуцируют развитие окислительного стресса, ограничивают процессы жизнедеятельности и продуктивность теплолюбивых растений. В последнее время благодаря селекции, расширился спектр раннеспелых и более устойчивых к холодовому воздействию сортов и гибридов кукурузы, что благоприятствует использованию данной культуры в растениеводстве северных регионов для выращивания на корм. По имеющимся данным в центральном агроклиматическом районе Республики Коми урожайность зеленой массы кукурузы варьирует от 200 до 700 ц/га [1, 2]. Столь значительный размах обусловлен погодными условиями сезона вегетации и, в первую очередь, недостатком тепла в отдельные периоды [3]. Нами отмечены низкие темпы роста и накопления биомассы растений после появления всходов, особенно на фоне довольно частых понижений ночной температуры [2, 3]. Это послужило основанием для более детального изучения последствий пониженной температуры на про-/антиоксидантный метаболизм и функциональную активность листьев молодых растений кукурузы.

Объект и методы исследования. Раннеспелый простой гибрид кукурузы Уральский 150 создан для использования в регионах с ограниченным вегетационным периодом. Растения выращивали в сосудах с почвой под светодиодными лампами ULI-P10-18W/SPFR IP40 (Китай). Плотность потока ФАР составляла 400 мкмоль/м²с, дневная температура 25-27 °С, ночная около 23 °С, фотопериод 12/12 ч. В фазу появления третьего настоящего листа часть растений в течение недели каждые сутки помещали на ночь в холодную камеру (температура 6 °С), утром растения возвращали в исходные условия. Растения для анализа отбирали в утренние часы сразу после экспозиции в холодной камере на четвертые и восьмые сутки от начала низкотемпературного воздействия и через трое суток после его прекращения. Контрольные растения действию пониженной температуры не подвергали.

Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), содержание пероксида водорода (H_2O_2) с помощью хемилюминесцентного метода. Общую активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли по способности фермента подавлять фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия. Активность аскорбатпероксидазы (APX) определяли по методу, основанному на регистрации оптической плотности раствора при окислении аскорбата. Активность каталазы (CAT) измеряли по количеству разложившегося H_2O_2 за единицу времени. Содержание растворимого белка анализировали по Bradford (1976). Процедуры выделения белка проводили при температуре 4 °C. Показатели флуоресценции хлорофилла *a* ФС2 измеряли с помощью портативного флуориметра РАМ-2100 (Walz, Германия), скорость CO_2 -газообмена с помощью ИК-газоанализатора Li-7000 (Licor Inc., США). Скорость дыхания измеряли по поглощению O_2 полярографически на Oxytherm system (Hansatech Inst., Англия). Активность терминальных оксидаз оценивали с помощью специфических ингибиторов. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США).

Результаты. Установлено, что содержание продуктов ПОЛ, H_2O_2 и активность ключевых антиоксидантных ферментов в листьях контрольных растений оставались практически стабильными в течение эксперимента. Характер изменения величин этих показателей у листьев опытных растений указывает на то, что охлаждение индуцировало развитие окислительного стресса (рис. 1).

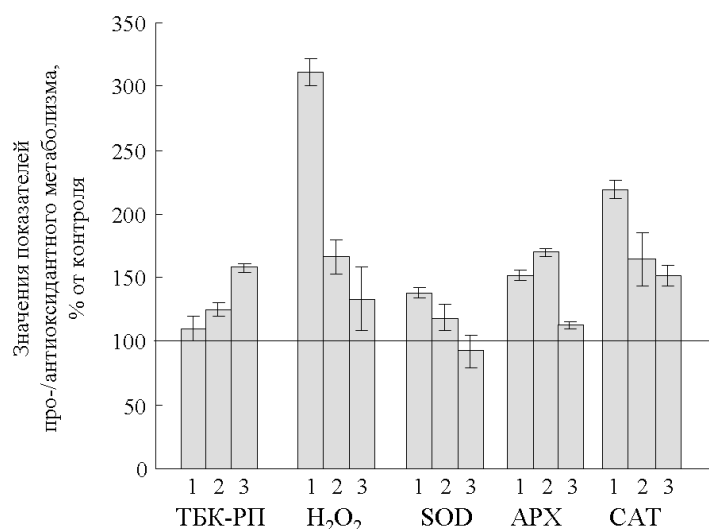


Рис.1. Влияние низкой положительной температуры (6 °C) в ночные часы на показатели про-/антиоксидантного метаболизма листьев кукурузы сорт Уральский 150 (в % от контроля): 1, 2 – опытные растения после 3 и 7 ночных экспозиций при 6 °C соответственно, 3 – спустя 3 суток после прекращения низкотемпературного воздействия. Линией обозначен контроль

После трех холодных ночей отмечали существенное, в 3 раза по сравнению с контролем, накопление H_2O_2 , тогда как содержание ТБК-РП изменялось незначительно. На фоне накопления H_2O_2 возрастала активность ферментов, нейтрализующих его. Уровень активности APX повышался в 1.5 раза, тогда как САТ более чем в 2 раза. Активность SOD, контролирующей концентрацию супероксид-радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$) путем его дисмутации до молекулярного кислорода и H_2O_2 , возрастала примерно в 1.4 раза. На седьмые сутки эксперимента содержание H_2O_2 значительно снижалось. Изменения в содержании концентрации H_2O_2 в клетке имеет большое значение, так как его молекулы участвуют в передаче сигнала в качестве вторичного мессенджера. Их накопление индуцирует значительные изменения в клеточном метаболизме, что может свидетельствовать об экспрессии чувствительных к холодовому стрессу генов [4]. Интересно, что спустя трое суток после прекращения холодового воздействия, уровень активности про-/антиоксидантного метаболизма не достиг контрольных значений. Листья опытных растений содержали в 1.2 раза больше H_2O_2 и в 1.5 раза больше продуктов липопероксидации. Сравнительно высоким оставался уровень активности САТ, тогда как различия в активности SOD и APX были незначительными. Таким образом, вовлечение антиоксидантной системы способствовало развитию адаптивных реакций растений кукурузы к действию низкотемпературного воздействия.

Исследования функционального состояния фотосинтетического аппарата растений не выявили существенных сдвигов в фотохимической эффективности ФС2 при сравнении контрольных и опытных растений. Величины максимального (F_v/F_m) и реального квантового выхода (Φ_{PSII}) флуоресценции хлорофилла *a* листьев контрольных и опытных растений, измеренные при одной и той же температуре (25 или 6 °C), значимо не отличались. Стабильность величины показателя F_v/F_m свидетельствует о сохранности фотосинтетического аппарата после холодового воздействия. В то же время, и у контрольных, и опытных растений отмечали достоверное повышение (в среднем в 1.3 раза) показателя нефотохимического тушения (q_N) и понижение в 7-8 раз показателя Φ_{PSII} при сравнении результатов измерений при 25 °C и 6 °C. Эти данные указывают на снижение эффективности использования энергии на фотосинтез при низкой положительной температуре у листьев молодых растений кукурузы. Результаты изучения показателей флуоресценции хлорофилла *a* ФС2 согласуются с данными прямых определений скорости видимого фотосинтеза (P_n). При температуре 6 °C величина P_n листьев контрольных и опытных растений была соответственно в 5 и 10 раз ниже, чем при 25 °C. Скорее всего, это обусловлено чувствительностью ферментов углеродного метаболизма листьев кукурузы к низкой температуре.

Нами выявлено, что подавление дыхательной активности листьев кукурузы низкой температурой в большей степени было связано с торможением цитохромного пути (ЦП), чем энергетически малоэффективного альтернативного дыхательного пути (АП). При этом листья опытных растений проявляли более высокую толерантность ЦП к снижению температуры по сравнению с листьями контрольных растений, не испытывающих ночного охлаждения. В результате вклад дыхательных путей в общее поглощение O_2 и соотношение ЦП/АП при пониженной температуре у листьев опытных растений изменялись в меньшей степени, чем у контрольных. Эти данные могут отражать способность кукурузы к акклимации.

Заключение. Нами установлены закономерности влияния низкотемпературного воздействия на функциональные показатели листьев ранне-спелого гибрида кукурузы Уральский 150 на начальных этапах роста и развития. Индукция активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты SOD, APX и CAT на фоне значительного увеличения содержания пероксида водорода отражают адаптацию растений к низкотемпературному стрессу. Накопление H_2O_2 , по-видимому, приводило к активации стресс-индуцируемых генов, способствующих акклимации и предотвращению холодового повреждения. Об этом может свидетельствовать тот факт, что опытные растения проявляли более высокую толерантность цитохромного дыхания к снижению температуры, сохраняли сравнительно высокую потенциальную фотохимическую эффективность фотосистемы 2 и мало отличались от контрольных по накоплению биомассы.

Работа выполнена по теме НИР № 122040600021-4 за счет средств федерального бюджета.

Библиографические ссылки

1. Вавилов П.П., Болотова Е.С. Некоторые особенности роста и развития кукурузы в северных районах ее возделывания // Тр. Коми филиала АН СССР, 1961. №11. С.57-69.
2. Головкин Т.К., Далькэ И.В., Шморгунов Г.Т., Триандофилов А.Ф., Тулинов А.Г. Рост растений и продуктивность кукурузы в холодном климате // Российская сельскохозяйственная наука, 2019. № 2. С.19-23. DOI: 10.31857/S2500-26272019219-24
3. Табаленкова Г.Н., Силина Е.В., Дымова О.В., Далькэ И.В., Головкин Т.К. Формирование урожая и качество зеленой массы кукурузы в условиях центрального агроклиматического района Республики Коми // Аграрная наука Евро-Северо-Востока, 2021. Т. 22, № 5. С. 689-697. DOI: 10.30766/2072-9081.2021.22.5.689-697
4. Zhou X., Muhammad I., Lan H., Xia C. Recent Advances in the Analysis of Cold Tolerance in Maize // Front. Plant Sci., 2022. Vol.13: 866034. DOI: 10.3389/fpls.2022.866034

Активные формы кислорода в биологии семян: от регуляторных функций к окислительному стрессу

Смоликова Г. Н.^{А*}

^А Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: g.smolikova@spbu.ru

Хорошо известно, что у растений генерация активных форм кислорода (АФК) зависит не только от окружающих условий, но и от стадий онтогенеза. В биологии семян также существуют стадии, когда АФК играют важные регуляторные функции. Наиболее известным является процесс прорастания, когда происходит инициация роста осевых органов, визуально проявляющаяся в «проклевывании» зародышевого корня [1, 2]. Генерация АФК, таких как гидроксил-радикал ($\cdot\text{OH}$) и супероксид-радикал ($\text{O}_2\cdot^-$), приводит к повреждению полисахаридов клеточных стенок и «снижению прочности клеток на разрыв», что позволяет растущему корню разорвать семенную кожуру и прилегающие к ней ткани эндосперма [3]. Предполагают, что АФК также способны окислять негативные регуляторы прорастания, приводя к активации передачи сигналов гиббереллинов (ГК) и инактивации сигналов абсцизовой кислоты (АБК) [4].

Вторым важным, но менее известным процессом, является т.н. «дозревание» семян (after-ripening). Это сложный биохимический процесс, происходящий в сухих зрелых семенах после опадения с материнского растения, в результате которого они выходят из покоя и приобретают готовность к прорастанию [5]. Молекулярная природа этого процесса долгое время оставалась загадкой, потому что он происходит на фоне отсутствия в клетках свободной воды. Однако, в последние годы активно развивается гипотеза о том, что выход из покоя у сухих семян обеспечивается за счет неферментативных процессов окисления и карбонилирования белков, приводящий к их модификации и изменению активности [6-8]. Что интересно, для успешного выхода из покоя важен порог влагосодержания: вода в клетках должна находиться только в связанном состоянии. Как только в покоящихся семенах появляется свободная вода, процесс дозревания прекращается и начинается процесс т.н. «старения» (seed ageing). Старение запускается тем, что начинается неконтролируемая генерация АФК, которая приводит к окислительному стрессу и связанному с ним повреждению клеточных мембран, белков и т.д. [9, 10].

Еще менее известным примером редокс-метаболизма, успешность которого зависит от баланса окислительно-восстановительных процессов, является фотосинтез, который имеет место в формирующихся семенах [11]. В ряде работ было показано, что фотосинтез может происходить не только в листьях [12-16]. Еще в 2003 году Aschan и Pfanzen [13], основываясь

на доступности атмосферного углекислого газа, выделили в растениях две группы фотосинтетически активных органов: (i) листья, стебли и зеленые органы цветков характеризуются чистой фотосинтетической ассимиляцией с использованием атмосферного CO_2 ; (ii) содержащая хлорофилл кора и древесные ткани, большинство плодов, корней и плодоносящих цветочных органов в основном выполняют нефотосинтетические функции, но способны усваивать CO_2 , выделяемое при дыхании. По этой причине фотосинтез в нелистовых тканях (non-foliar photosynthesis) часто интерпретируют как процесс рефиксации CO_2 , вырабатываемого в результате клеточных метаболических процессов.

Нелистовой тип фотосинтеза присущ также формирующимся семенам многих видов растений [11, 17-23]. При этом установлено, что функционирование фотосинтетического аппарата семян направлено не на синтез моносахаридов, как в листьях, а на синтез запасных соединений [24-27]. НАДФН и АТФ, образующиеся в семядолях, далее расходуются на превращение поступающей из материнского растения сахарозы в ацетил-СоА, жирные кислоты и триглицериды [18, 23, 25, 26, 28]. Однако механизмы фотозависимых синтетических реакций, связанные с накоплением запасных питательных веществ в семенах, требуют более глубокого изучения. Часто возникает вопрос как зародыши семян, покрытые тканями перикарпия и кожуры, получают достаточное количество света для обеспечения энергией фотохимических реакций. Нами было показано, что фотохимически активная радиация, проходящая сквозь покровные ткани плодов гороха и достигающая семядолей на фотохимически активных ранней и средней стадиях созревания семян, характеризовалась высокой долей зеленого и дальнего красного света, при этом синий свет отсутствовал, а количество красного света составляло около 2% [29]. При этом, несмотря на низкую энергетическую освещенность и спектральные диапазоны, не характерные для фотосинтеза листа, семядоли были фотохимически активными.

В докладе на примере растений гороха (*Pisum sativum* L.) будет проведен сравнительный анализ фотохимической активности в листьях и нелистовых зеленых тканях (перикарпия, кожуры и семядолей) на основе методологии РАМ-флуориметрии [21, 22, 30]. Данная методология позволяет оценить эффективность преобразования световой энергии в химическую путем анализа кинетики возбуждения и гашения флуоресценции хлорофиллов (Хл). Флуоресценция испускается, в основном, молекулами Хл *a* антенных комплексов фотосистемы 2 (ФС II) и ее кинетика напрямую связана с окислительно-восстановительными реакциями в цепи переноса

электронов [30]. Полученные нами данные позволяют глубже понять механизмы протекания фотохимических реакций, которые в значительной степени влияют на процессы эмбриогенеза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20–16–00086–П.

Библиографические ссылки

1. Smolikova G., Medvedev S. Seed-to-seedling transition: Novel aspects. *Plants* 2022, 11: 1988.
2. Smolikov, G., Strygina K., Krylova E., Leonov, T., Frolov A., Khlestkina E., Medvedev S. Transition from seeds to seedlings: hormonal and epigenetic aspects. *Plants* 2021, 10: 1884.
3. Steinbrecher T., Leubner-Metzger G. Tissue and cellular mechanics of seeds. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2018, 51: 1–10.
4. Bailly, C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochem. J.* 2019, 476: 3019–3032.
5. Chahtane H., Kim W., Lopez-Molina L. Primary seed dormancy: a temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. *J. Exp. Bot.* 2016, 68: erw377.
6. Oracz K., Bouteau H.E.M., Farrant J.M., Cooper K., Belghazi M., Job C., Job D., Corbineau F., Bailly C., El-Maarouf Bouteau, H. et al. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J.* 2007, 50: 452–65.
7. El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal. Behav.* 2008, 3: 175–182.
8. Leonova T., Popova V., Tsarev A., Henning C., Antonova K., Rogovskaya N., Vikhnina M., Baldensperger T., Soboleva A., Dinastia E. et al. Does protein glycation impact on the drought-related changes in metabolism and nutritional properties of mature pea (*Pisum sativum* L.) seeds? *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21: 567.
9. Sano, N., Rajjou, L., North, H.M., Debeaujon, I., Marion-Poll, A., Seo, M. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. *Plant Cell Physiol.* 2016, 57, : 660–674.
10. Smolikova G., Leonova T., Vashurina N., Frolov A., Medvedev S. Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 22: 101.
11. Смоликова Г.Н., Медведев С.С. Фотосинтез в семенах хлороэмбриофитов. *Физиология растений* 2016, 63: 3–16.
12. Lawson T., Milliken A.L. Photosynthesis – beyond the leaf. *New Phytol.* 2023, 238, 55–61.
13. Aschan, G., Pfanz, H. Non-foliar photosynthesis - A strategy of additional carbon acquisition. *Flora* 2003, 198: 81–97.
14. Burgess A.J., Degen G.E. Pod power: Soybean pod and seed photosynthesis contributes to yield. *Plant Physiol.* 2023, 193: 886–887.
15. Cho Y.B., Stutz S.S., Jones S.I., Wang Y., Pelech E.A., Ort D.R. Impact of pod and seed photosynthesis on seed filling and canopy carbon gain in soybean. *Plant Physiol.* 2023, 193: 966–979.
16. Yanykin D., Sundyreva M., Khorobrykh A., Semenova G., Savchenko T. Functional characterization of the corticular photosynthetic apparatus in grapevine. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2020, 1861: 148260.

17. Borisjuk L., Rolletschek H., Walenta S., Panitz R., Wobus U., Webe, H. Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. *Plant J.* 2003, 36: 318–329.
18. Alloreant G., Osorio S., Ly Vu J., Falconet D., Jouhet J., Kuntz M., Fernie A.R., Lerbs-Mache S., Macherel D., Courtois F., et al. Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 2015, 205: 707–719.
19. Brazel A.J., Ó'Maoiléidigh D.S. Photosynthetic activity of reproductive organs. *J. Exp. Bot.* 2019, 70: 1737–1754.
20. Smolikova G., Dolgikh E., Vikhnina M., Frolov A., Medvedev S. Genetic and hormonal regulation of chlorophyll degradation during maturation of seeds with green embryos. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18: 1993.
21. Smolikova G., Kreslavski V., Shiroglazova O., Bilova, T., Sharova E., Frolov A., Medvedev S. Photochemical activity changes accompanying the embryogenesis of pea (*Pisum sativum*) with yellow and green cotyledons. *Funct. Plant Biol.* 2018, 45: 228.
22. Smolikova G., Shiroglazova O., Vinogradova G., Leppyanen I., Dinastiya E., Yakovleva O., Dolgikh E., Titova G., Frolov A., Medvedev S. Comparative analysis of the plastid conversion, photochemical activity and chlorophyll degradation in developing embryos of green-seeded and yellow-seeded pea (*Pisum sativum*) cultivars. *Funct. Plant Biol.* 2020, 47: 409–424.
23. Shackira A.M., Sarath N.G., Aswathi K.P.R., Pardha-Saradh, P., Puthur J.T. Green seed photosynthesis: What is it? What do we know about it? Where to go? *Plant Physiol. Reports* 2022, 27: 573–579.
24. Neuhaus H.E., Emes M.J. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000, 51: 111–140.
25. Ruuska S.A., Schwender J., Ohlrogge J.B. The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. *Plant Physiol.* 2004, 136: 2700–2709.
26. Allen D.K., Ohlrogge J.B., Shachar-Hil Y. The role of light in soybean seed filling metabolism. *Plant J.* 2009, 58: 220–234.
27. Hu Y., Zhang Y., Yu W., Hänninen H., Song L., Du X., Zhang R., Wu J. Novel insights into the influence of seed sarcotesta photosynthesis on accumulation of seed dry matter and oil content in *Torreya grandis* cv. “Merrillii.” *Front. Plant Sci.* 2018, 8: 2179.
28. Puthur J.T., Shackira A.M., Saradhi P.P., Bartels D. Chloroembryos: A unique photosynthesis system. *J. Plant Physiol.* 2013, 170: 1131–1138.
29. Смоликова Г.Н., Степанова Н.В., Камионская А.М., Медведев С.С. Фотохимическая активность формирующихся семядолей гороха (*Pisum sativum* L.) зависит от светопропускания покровных тканей и спектрального состава света. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2023, 27: 980–987.
30. Гольцев В.Н., Каладжи Х.М., Паунов М., Баба В., Хорачек Т., Мойски Я., Коцел Х., Аллахвердиев С.И. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений. *Физиология Растений* 2016, 63: 881–907.

Потеря калия корнями пшеницы при окислительном стрессе

Соколик А. И.^{А*}, Палтарак А. С.^А, Демидчик В. В.^А

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: sokolik@bsu.by

Общей чертой ответа растений на действие стрессовых факторов является отток электролитов из клеток корня, в первую очередь K^+ . В то же время, согласно последним исследованиям, отток ионов калия происходит через избирательные к калию ионные каналы, которые активируется активными формами кислорода. Однако конкретных данных по непосредственному измерению выхода калия из корней растений при стрессе явно недостаточно. В настоящей работе с использованием пламенно-фотометрического определения концентрации калия в растворе проведены непосредственные измерения выхода ионов калия из клеток корней пшеницы в ответ на окислительный стресс.

В качестве объекта исследования использовались корни 7-дневных проростков твердой яровой пшеницы сорта «Людмила», выращенные в водной культуре на половинном растворе Кнопа рулонным методом, а также фотометрические – измерение уровня калия в опытном растворе (0,1 мМ хлорида кальция) методом прямого определения концентрации ионов в растворе при помощи пламенного фотометра Sherwood Scientific M410.

Был проведен ряд экспериментов по изучению выхода калия из корней пшеницы под действием различных концентраций АФК-генерирующей смеси ($CuCl_2$, аскорбиновая кислота, H_2O_2) и блокатора калиевых каналов ТЭА⁺. В настоящей работе было показано, что АФК-генерирующая смесь ($CuCl_2$, АК, H_2O_2) вызывает выход калия с постоянной в течение 3 ч скоростью. Добавление блокатора калиевых каналов ТЭА⁺ в концентрации 3 мМ на 63% подавляет этот процесс, что свидетельствует о решающем участии в выходе калия АФК-зависимых калиевых каналов, по-видимому, относящихся к семейству GORK. Неполное блокирование выхода калия означает участие в этом процессе, по всей видимости, и неселективных катионных каналов плазмалеммы клеток корня проростков пшеницы.

Показано, что скорость выхода калия из корней проростков пшеницы возрастает в ходе увеличения концентрации АФК-генерирующей смеси в диапазоне от 0,01 до 1,0 мМ, причем возрастание скорости снижается по мере роста концентрации стрессора.

Анализ зависимости «доза–эффект» скорости выхода калия с использованием ферментативной кинетики Михаэлиса–Ментен показал, что при низких концентрациях АФК-генерирующей смеси (до 0,1 мМ) процесс

происходит в соответствии с кинетикой ферментативных реакции (сохраняется линейность зависимости в обратных координатах) с кажущейся константой Михаэлиса K_M 0,013 мМ. При более высоких концентрациях зафиксированы существенные отклонения от этой модели, а именно скорость реакции при концентрациях АФК-генерирующей смеси 0,3 мМ и 1 мМ оказывается в 2 раза выше, чем если бы кинетика Михаэлиса–Ментен выполнялась во всем диапазоне. Таким образом, по-видимому, с возрастанием концентрации стрессора происходит изменение характера взаимодействия АФК с АФК-чувствительным сайтом канала GORK.

Активность про/антиоксидантной системы в почках возобновления очитника трехлистного в процессе перезимовки

Табаленкова Г. Н.^{А*}, Силина Е. В.^А, Малышев Р. В.^А

^А *Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН.
Россия, г. Сыктывкар, *E-mail: tabalenkova@ib.komisc.ru*

Климатические условия среды являются важным фактором, определяющим распространение растений. Большая часть растений умеренной зоны в течение года подвергается действию низких отрицательных температур, и характер реакции растения на температурное воздействие зависит от напряженности действующего фактора (интенсивности и продолжительности), генетически обусловленной устойчивости и физиологического состояния растения. Важнейшим адаптивным признаком, возникшим в эволюции растений, как приспособление к перенесению неблагоприятных периодов года является сезонная ритмичность роста и развития. Периодичность роста наблюдается у всех растений, период усиленной жизнедеятельности сменяется периодом ослабления и даже почти полным прекращением ее – покоем. Различают глубокий покой, при котором рост не возобновляется даже при благоприятных условиях внешней среды и вынужденный покой, который вызван неблагоприятными условиями произрастания и прекращается при их отсутствии. Особо чувствительными к абиотическим факторам являются меристематические ткани почек возобновления, где осуществляются процессы роста, пролиферации и дифференциации клеток и тканей и локализованы многие рецепторные системы, воспринимающие изменения во внешней среде. В годовой динамике температур в районе исследований четко выражен достаточно продолжительный холодный период, когда преобладают отрицательные температуры и активная жизнедеятельность растений невозможна. Физиологические и морфологические особенности почек возобновления позволяют им переносить неблагоприятные периоды года. Неблагоприятные воздействия

окружающей среды являются основной причиной избыточного образования активных форм кислорода (АФК), которые образуясь в процессе метаболизма, модулируют процессы жизнедеятельности растений и являются компонентами адаптивных реакций. Почки возобновления являются хорошей моделью для изучения процессов роста, метаболизма и биоэнергетики под влиянием факторов среды (свет, температура). Подобные исследования могут дать новую информацию о физиолого-биохимических и молекулярных механизмах роста побега на этапе внутривушечного роста под влиянием экзогенных и эндогенных факторов.

Целью данной работы было изучение состояния воды, уровня перекисного окисления липидов, содержания пероксида водорода, растворимого белка и активность супероксиддисмутазы в почках возобновления очитника трехлистного в процессе перезимовки.

Объектом исследований служили почки возобновления очитника трехлистного (*Hylotelephium triphyllum* (Haw.) Holub.) – многолетнее травянистое растения семейства *Crassulaceae*. Почки возобновления этого вида относятся к типу гемикриптофиты, закладываются в основании прошлогодних побегов по периферии куста, находятся на уровне субстрата. Почки возобновления открытые не имеют кроющихся чешуй защищены опадом и снежным покровом. Для растений очитника трехлистного характерен вынужденный покой, т.е. почки возобновления в благоприятных условиях могут расти течение круглого года (Головкин и др. 2007). Исследования проводили в течение вегетационного периода 2021–2023 гг. Использовали растения, произрастающие на дерново-слоистой песчано-супесчаной хорошо дренируемой почве в заливаемой части пойменной террасы р. Сысолы. Почки возобновления очитника трехлистного отбирали в конце сентября, октябре и апреле. Растения (20–25 шт.) выкапывали и переносили в лабораторию. Определение температуры кристаллизации и долю свободной воды в свежих почках проводили на дифференциальном сканирующем калориметре DSC – 60 Shimadzu (Япония). С помощью программного обеспечения для DSC–60 «TA 60 Version 1.33» определяли начало фазового перехода вода–лёд. По площади экзотермического пика с использованием коэффициента удельной теплоты кристаллизации воды (330 Дж/кг) рассчитывали количество воды, претерпевшей фазовый переход. Оводненность тканей оценивали по разности сырой и сухой массы образцов, и выражали в процентах. Полученные количественные значения фракций воды в тканях выражали в долях по отношению к общему содержанию воды (Малышев, 2021). Для биохимических анализов с подземной части побега отрезали апикальные почки, фиксировали жидким азотом и хранили при температуре -80°C. Активность перекисного окисления ли-

пидов оценивали по содержанию в почках продуктов, реагирующих и тиобарбитуровой кислотой (ТБК – РП), содержание перекиси водорода определяли с использованием ксиленолового оранжевого, растворимого белка по методу Bradford, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Активность каталазы (САТ) измеряли по количеству разложившегося H_2O_2 за единицу времени. Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли по её способности подавлять фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия. Анализ жирных кислот выполняли в ЦКП «Хроматография» Института биологии Коми НЦ УрО РАН, их определяли в виде метиловых эфиров после проведения кислотного метанолиза липидов с последующей этерификацией выделившихся кислот. Количественное определение индивидуальных кислот проводили методом внутреннего стандарта. Все анализы выполняли в 3-кратной биологической и 2-3 кратной аналитической повторности. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США).

Результаты. Интенсивность протекания физиологических процессов во многом определяется оводненностью тканей. Оводненность почек возобновления очитника трехлистного составляла в среднем около 80%. Весной (апрель) и в летний период (август) преобладала фракция свободной воды, поздней осенью (ноябрь) и зимой (декабрь) в почках появлялась фракция связанной воды, что обусловлено ростом концентрации криопротекторов, связывающих значительное количество воды. Согласно данным, полученным с помощью калориметрии, фазовый переход вода – лед происходил в летний период (август) при температуре до $-6^{\circ}C$, а в течение осени, зимы и весны колебался от $-3.9^{\circ}C$ в сентябре до $-4.7^{\circ}C$ в декабре. Снижение активности метаболических процессов в осенний период сопровождается образованием ряда соединений, необходимых для сохранения клеточных структур при действии низких температур (Алаудинова и др., 2010). Одним из показателей уровня окислительного стресса служит интенсивность перекисного окисления липидов. Анализ данных показал, что до наступления отрицательных температур (сентябрь) почки возобновления характеризовались относительно низким содержанием продуктов липопероксидации и пероксида водорода (таблица 1).

Характер изменения величин этих показателей с понижением температуры в октябре и переходом растений в состояние вынужденного покоя указывает на индуцирование в почках возобновления окислительного стресса. В этот период отмечали увеличение в 1.5 раза по сравнению с сентябрем, продуктов ТБК-РП и содержания H_2O_2 , при снижении уровня активности каталазы – фермента нитрализующего H_2O_2 Активность супе-

роксиддисмутазы (SOD), контролирующей концентрацию супероксид-радикала ($O_2^{\cdot-}$) путем его дисмутации до молекулярного кислорода и H_2O_2 , возрастала за этот период примерно на 19% с 4.4 ± 0.3 до 5.4 ед/мг белка. В период вынужденного покоя (октябрь - апрель), вызванного низкими температурами в почках очитника трехлистного происходит постепенное формирование новых меристиматических зон. В ходе формообразовательных процессов отмечается усиление активности супероксиддисмутазы, каталазы, накопление пероксида и растворимого белка. Важное значение для растений при адаптации к абиотическим и биотическим стрессорам имеет метаболизм жирных кислот, которые необходимы для поддержания текучести мембран (Los et al., 2013; Берестовой и др. 2019). Как показал анализ жирнокислотного состава почек возобновления 76% суммы всех жирных кислот приходилось на ненасыщенные кислоты (ННЖК), в основном на линолевую (C18:2) и линоленовую (C18:3). Насыщенные жирные кислоты (НЖК) были представлены пальмитиновой (16:0) и стеариновой (18:0) кислотами. На протяжении всего времени наблюдения доля ННЖК в два–три раза превышала долю НЖК. Максимальное количество ННЖК в основной линолевой и линоленовой кислот, отмечалось в сентябре, что определяется их низкой температурой плавления поэтому содержащие их фосфолипиды остаются жидкими при низких положительных температурах. Следует отметить, что максимальное накопление жирных кислот за счет высокой активности линолеил-десатураз сопровождается снижением доли свободной воды. Полагают, что рост уровня линолената связан с подготовкой растений к перезимовке и всегда коррелирует с закаливанием (Нарайкина и др., 2020). При возобновлении формообразовательных процессов наблюдается увеличение содержания ННЖК за счет линолевой и линоленовой кислот, которые являются необходимыми компонентами мембран хлоропластов и способствуют формированию фотосинтетического аппарата (Марковская и др., 2013; Los et al., 2013). Увеличение содержания жирных кислот совпадало с весенним максимумом содержания хлорофиллов и каротиноидов.

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-РП), пероксида водорода (H_2O_2), активности супероксиддисмутазы (SOD) и каталазы (CAT) в почках возобновления очитника трехлистного в процессе перезимовки

Период отбора образцов, месяц	ТБК-РП, нмоль/г сырой массы	H_2O_2 , мкмоль/г сырой массы	SOD, ед/мг белка	CAT, мкмоль H_2O_2 / мг белка мин	Растворимый белок, мг/г сухой массы
IX	54.8 ± 1.8	5.8 ± 0.3	4.4 ± 0.3	3.1 ± 0.7	
XI	82.1 ± 2.5	8.7 ± 0.7	5.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	4.58 ± 0.3
IV	71.8 ± 8.2	9.4 ± 1.7	8.6 ± 0.7	8.6 ± 0.7	6.52 ± 2.9

Заключение. Нами установлены закономерности влияния перезимовки на физиолого-биохимические показатели почек возобновления очитника трехлистного. Выявлены сезонные изменения в почках содержания пероксида, белка, жирнокислотного состава. Показано, что характер изменения активности SOD, CAT и ТБК-РП с понижением температуры, и переходом растений в состояние вынужденного покоя указывает на индуцирование в почках возобновления окислительного стресса. Увеличение содержания H_2O_2 , повышенная активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты, накопление белка и ННЖК служили сигналом к активированию формообразовательных процессов в почках весной, а также является одним из важнейших признаков устойчивости растений к возможному понижению температуры.

Работа выполнена в рамках темы № 122040600021-4.

Библиографические ссылки

1. Алаудинова Е.В., Симкина С.Ю., Миронов П.В. Водорастворимые вещества меристем почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L.: содержание, состав и свойства при формировании состояния низкотемпературной устойчивости // Сибирский экологический журнал. 2010. №2. С. 227–333.
2. Берестовой М.А., Павленко О.С., Голденкова-Павлова И.В. Десатуразы жирных кислот растений: роль в жизнедеятельности растений и биотехнологический потенциал // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139. №4. С. 338–351
3. Головкин Т.К., Дальке И.В., Бачаров Д.С., Бабак Т.В., Захожий И.Г. Толстянковые в холодном климате. 2007. СПб. 205 с.
4. Малышев Р.В. Определение свободной и связанной воды в растительных тканях с различным осмотическим давлением, сравнительный анализ метода высушивания над водоотнимающей средой и дифференциальной сканирующей калориметрии // Успехи современной биологии. 2021. Т.141. №2. С. 164–171
5. Марковская Е.Ф., Сысоева М.И., Шерудилов Е.Г. 2013. Кратковременная гипотермия и растение. Петрозаводск. 194 с.
6. Нарайкина Н.И., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Трунова Т.И. Изменение в жирнокислотном составе и в содержании липидов листьев картофеля при низкотемпературном закаливании: роль $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы // Физиология растений. 2020. Т.47. №2. С. 149–156.
7. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // Photosynthesis Research. 2013. № 2–3. P.489–509.

Воздействие CuO-НЧ и Fe₃O₂-НЧ на рост корней *Arabidopsis thaliana*

Тарима В. В.^А, Мучинская П. О.^А, Мацкевич В. С.^А, Самохина В. В.^{А*}

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: samokhina@bsu.by

Наночастицы (НЧ) широко применяются в различных сферах: в медицине в качестве лекарств, биосенсоров или агентов, доставляющих лекарственные вещества внутрь клетки, в промышленности при создании покрытий и прочных материалов, в сельском хозяйстве в виде наноудобрений, в экологии для мониторинга окружающей среды и т.д. Влияние НЧ на растения может быть разнообразным и зависит от типа НЧ, их физико-химических свойств, концентрации, времени воздействия, а также вида растения. В литературе описаны как позитивные, так и токсические эффекты металлических НЧ, однако механизм их действия до конца не ясен.

В настоящей работе был проведен сравнительный анализ влияния наночастиц и ионной формы двух редокс-активных металлов-микроэлементов (меди и железа) на ростовые параметры модельного растения *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Было показано, что в невысоких концентрациях (10 мг/л), как при продолжительном, так и однократном воздействии, CuO-НЧ стимулировали рост корней арабидопсиса, тогда как более высокие уровни НЧ (30-1000 мг/л) не оказывали влияния (рис. 1а). Ионная форма меди (CuCl₂) при продолжительном воздействии (5-кратное накопление) на корни *A. thaliana* в концентрации 10 мг/л стимулировала их рост, тогда как при однократном – ингибировала. В высоких концентрациях (30-1000 мг/л) CuCl₂ ингибировал рост основного корня арабидопсиса.

При анализе архитектуры корня было обнаружено, что CuO-НЧ вызывали уменьшение диаметра зоны всасывания корня в диапазоне концентраций 10-1000 мг/л при продолжительном накоплении и в диапазоне концентраций 100-1000 мг/л при однократном воздействии. Ионная форма меди (CuCl₂) также уменьшала диаметр зрелой зоны корня в концентрациях от 10 до 1000 мг/л. Уменьшение длины зоны роста растяжением наблюдалось при действии 100-1000 мг/л CuO-НЧ и 10-1000 мг/л CuCl₂. Воздействие CuO-НЧ в концентрациях 30-1000 мг/л уменьшало диаметр зоны деления корня арабидопсиса, в то время как ионная форма меди вызывала уменьшение данного параметра, начиная с концентрации 10 мг/л. При обработке растений наночастицами железа (продолжительном и однократном) в концентрациях 30-300 мг/л наблюдалась стимуляция роста корней арабидопсиса (рис. 1б), в то время как FeCl₃ в концентрациях от 10 мг/л до 100 мг/л стимулировал рост корней *A. thaliana*, а 300 мг/л и 1000 мг/л – ингибировал. Диаметр корня в зоне деления и в зоне всасывания, а

также длина зоны роста растяжением увеличивалась при обработке Fe_3O_4 -НЧ в концентрациях 100 мг/л, 300 мг/л и 1000 мг/л. При добавлении железа в ионной форме такого эффекта не наблюдалось. После 5-дневного накапливания Fe_3O_4 -НЧ диаметр корня арабидопсиса в зрелой зоне, а также длина зоны роста растяжением не менялись. Наиболее чувствительной являлась зона деления корня. Диаметр корня в данной зоне при обработке концентрациями 30-1000 мг/л уменьшается на 20-30%. Накапывание FeCl_3 на корни арабидопсиса вызывало уменьшение диаметра корня в зрелой зоне на 16% при концентрации 1000 мг/л, уменьшение диаметра в зоне деления на 30-50% при 10-1000 мг/л. Также отмечалось увеличение длины зоны роста растяжением на 41% при обработке FeCl_3 в концентрации 100 мг/л и уменьшение при воздействии ионов железа в концентрациях 300 мг/л и 1000 мг/л на 29% и 36% соответственно.

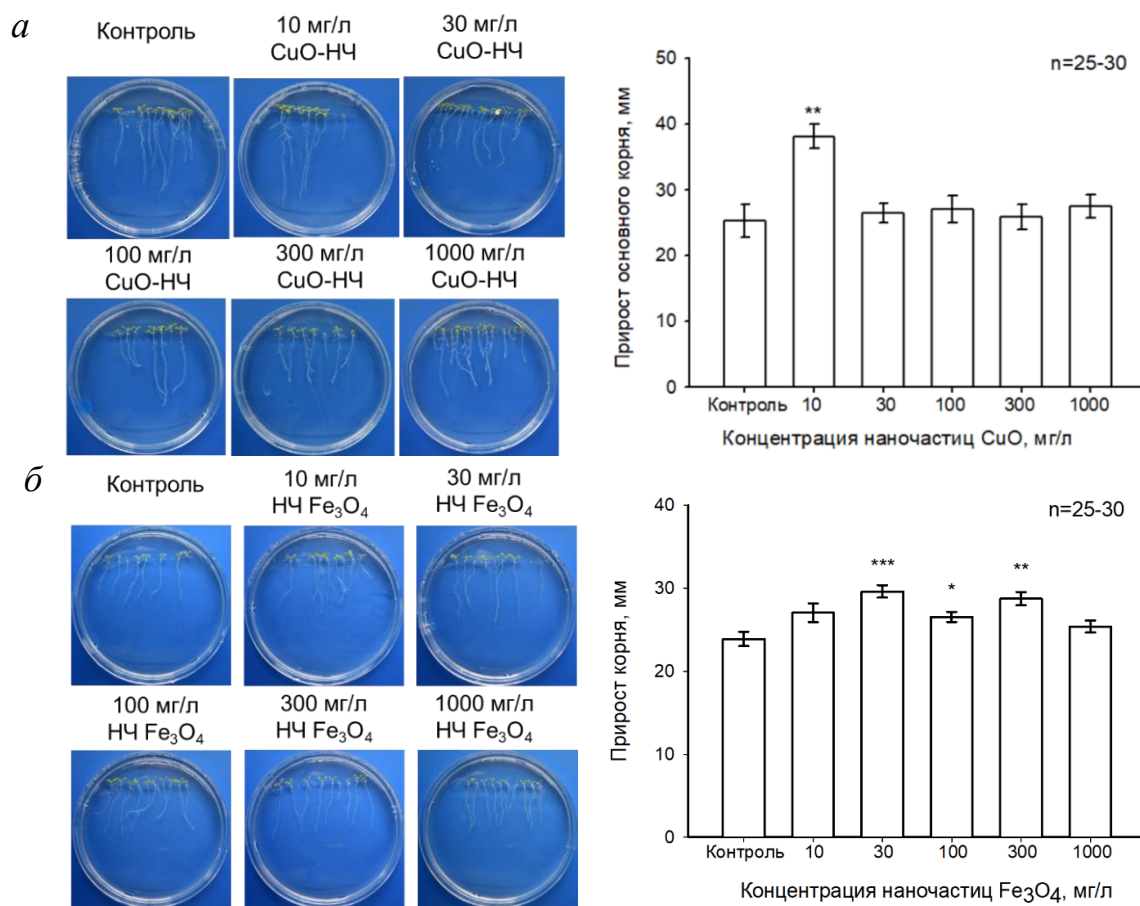


Рис. 1. Изменение роста *A. thaliana* при 5-кратной обработке НЧ оксида меди (а) и оксида железа (б). Прирост длины основного корня ($\bar{X} \pm S_x$, $n=25-30$) измерялся на 5 сут воздействия НЧ, достоверности различий рассчитывалась по отношению к контролю при помощи ANOVA-теста, где * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Таким образом, показано, что в ионной форме медь и железо демонстрируют больший ингибирующий эффект на ростовые процессы у арабидопсиса по сравнению с наноформой данных металлов. Более того, низкие уровни НЧ оксидов металлов (10 мг/л для CuO-НЧ и 100-300 мг/л для Fe₃O₄-НЧ) оказывают стимулирующее действие на рост и архитектуру корня, что может иметь практическое значение для разработки нанодобровений (корнестимулирующих препаратов).

Работа выполнена в рамках задания ГПНИ (№ ГР 20211705).

Влияние засоления на интенсивность окислительных процессов и активность компонентов антиоксидантной системы в листьях пшеницы

Таскина К. Б.^{А*}, Игнатенко А. А.^А, Нилова И. А.^А, Казнина Н. М.^А

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

**E-mail: tasamayaksenia@gmail.com*

Натрий-хлоридное засоление во многих регионах является основным фактором, лимитирующим рост и продуктивность сельскохозяйственных растений. Высокие концентрации соли в почве препятствуют поступлению воды и питательных веществ в растения, что приводит к водному дефициту и дисбалансу макро- и микроэлементов, и, как следствие, к осмотическому и ионному стрессу. Помимо этого, при засолении в клетках из-за резкого повышения уровня активных форм кислорода (АФК) развивается окислительный стресс, приводя к нарушению структуры и функций клеточных мембран. В защите клеток от избыточного количества АФК участвует антиоксидантная система (АОС), включающая антиоксидантные ферменты и неферментные соединения. Известно, что в условиях засоления активизируются компоненты АОС, что во многом зависит от концентрации соли в среде роста. Однако экспериментальных данных, подтверждающих это, относительно немного. Вследствие этого целью данной работы явилось сравнительное изучение влияния умеренного и сильного натрий-хлоридного засоления на интенсивность окислительных процессов и активность компонентов АОС в листьях пшеницы.

Исследования проводились в контролируемых условиях на проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.) ярового сорта Злата при температуре 22–25°C, влажности 60–70%, освещенности ФАР 100 мкмоль/(м² с) и 14-ти часовом фотопериоде. Контрольные растения выращивали на питательном растворе Хогланда-Арнона, в опытных вариантах к питательному

раствору добавляли NaCl в умеренной (100 мМ) и высокой концентрации (150 мМ). О реакции 7- суточных проростков на разные уровни засоления судили по изменению (по отношению к контролю) проницаемости мембран, интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), активности основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и гваяколспецифической пероксидазы (ГвПО), содержанию пролина и каротиноидов. Все измерения проводили на первом листе. Выход электролитов измеряли с использованием кондуктометра ("HANNA", Италия) (Гришенкова, Лукаткин, 2005). Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) (Stewart, Bewley, 1980). Активность СОД, КАТ, ГвПО определяли спектрофотометрически. Содержание белка анализировали методом Бредфорда (Bradford, 1976). Содержание свободного пролина определяли с помощью нингидринового реактива (Bates et al., 1973). Концентрацию каротиноидов определяли с использованием спектрофотометра СФ-2000 ("Спектр", Россия), экстрагируя 80%-м ацетоном (Шлык, 1971).

Проведенные исследования показали, что оба уровня засоления увеличивают проницаемость мембран клеток листа у проростков пшеницы. Так, при использовании NaCl в умеренной концентрации (100 мМ) проницаемость мембран возрастала на 38% по сравнению с контролем, а при высокой концентрации (150 мМ) – на 64% (рис. 1а). При этом наблюдалось заметное усиление интенсивности ПОЛ, о чем можно судить на основании повышения содержания МДА (почти в 2 раза по отношению к контрольным растениям при обеих изученных концентрациях) (рис. 1б). Полученные данные свидетельствуют о развитии окислительного стресса у проростков пшеницы в этих условиях.

Поскольку заметную роль в защите клеток от окислительного стресса играют антиоксидантные ферменты, нами была изучена активность СОД, КАТ и ГвПО в листьях пшеницы при разных уровнях засоления (табл. 1). Обнаружено, что при умеренном засолении общая активность СОД оказалась в 1.3 раза меньше, чем в контроле. При высокой концентрации соли активность этого фермента снизилась в еще большей степени (в 1.6 раз по отношению к контролю). При концентрациях NaCl 100 и 150 мМ наблюдалось также уменьшение (в 1.5 раза) активности ГвПО, тогда как активность КАТ в обоих вариантах опыта возрастала в 2 и 2.5 раза по отношению к контролю, соответственно.

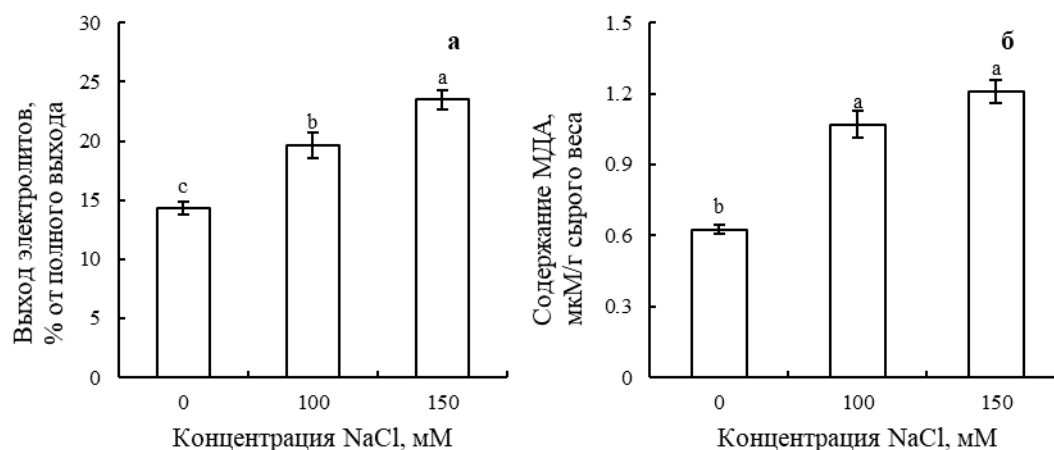


Рис. 1. Влияние засоления на выход электролитов (а) и содержание МДА (б) в листьях пшеницы сорта Злата. Разные латинские буквы означают достоверные различия показателя с контролем при $p < 0.05$

Неферментные компоненты АОС, в том числе пролин и каротиноиды, также вносят большой вклад в сохранение окислительно-восстановительного баланса клеток в стрессовых условиях. В наших опытах в условиях засоления наблюдалось значительное повышение содержания пролина, что во многом зависело от концентрации соли в среде роста. Так, при воздействии хлорида натрия в умеренной концентрации содержание пролина оказалось выше, чем в контроле в 3 раза, а при высокой концентрации соли – в 7 раз. Возрастало также содержание каротиноидов в 1.3 раза по сравнению с контролем в условиях умеренного засоления и в 1.5 раза – в условиях сильного засоления.

Таблица 1

Влияние засоления на активность антиоксидантных ферментов в листьях пшеницы с. Злата

Показатели	Варианты опыта				
	контроль	100 mM NaCl	% к контр	150 mM NaCl	% к конт.
Активность СОД, у.е. активности/ мг белка	0.359±0.039 ^a	0.276±0.023 ^a	23	0.223±0.020 ^b	38
Активность КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /(мг белка·мин)	178.8±7.75 ^c	380.5±13.5 ^b	213	440.5±18.5 ^a	246
Активность ГвПО, мкмоль тетраГв/ (мг белка·мин)	0.146±0.011 ^a	0.098±0.003 ^b	67	0.101±0.006 ^b	68

Примечание. Здесь и в табл. 2 разные латинские буквы означают достоверные различия показателя с контролем при $p < 0.05$.

Таблица 2

Влияние засоления на содержание пролина и каротиноидов в листьях пшеницы с. Злата

Показатели	Варианты опыта				
	контроль	100 мМ NaCl	% к контролю	150 мМ NaCl	% к контролю
Содержание свободного пролина, мкМ/г сырого веса	1.50±0.24 ^c	4.56±0.74 ^b	304	10.83±0.58 ^a	720
Содержание каротиноидов, мг/г сырой массы	0.236±0.022 ^c	0.319±0.005 ^b	136	0.360±0.010 ^a	153

Таким образом, проведенные исследования показали, что хлорид натрия в умеренной (100 мМ) и высокой (150 мМ) концентрациях приводит к усилению интенсивности ПОЛ и повышению проницаемости мембран в листьях пшеницы. Защиту клеток от окислительного стресса в этих условиях обеспечивают неферментные соединения, такие как пролин и каротиноиды, содержание которых резко возрастало при засолении, причем в соответствии с концентрационной зависимостью. Увеличения активности СОД и ГвПО не происходило, однако повышалась активность КАТ, что указывает на ее участие в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток в условиях засоления.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0004).

Библиографические ссылки

1. Гришенкова Н. Н., Лукаткин А. С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3–11.
2. Stewart R. R. C., Bewley J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // Plant Physiol. 1980. Vol. 65. P. 245–248.
3. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
4. Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. Vol. 39, no. 1. P. 205–207.
5. Шлык А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биологические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154–170.

Влияние УФ-С на рост и накопление АФК в клетках корня *Arabidopsis thaliana*

**Толкач А. А.^А, Микша К. Ч.^А, Муравицкая А. О.^А, Самохина В. В.^А,
Мацкевич В. С.^А**

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: matskevich@bsu.by

Растения ведут прикрепленный образ жизни и постоянно подвергаются воздействию стрессовых факторов, таких как засуха, загрязнение окружающей среды, изменения температуры и УФ-излучение. В последние годы показано, что умеренное УФ-С-излучение может стимулировать рост и развитие растений, увеличивая их фотосинтетическую активность и повышая содержание хлорофилла [1]. Однако, если интенсивность УФ-С излучения чрезмерна, обработка им может вызывать повреждения ДНК и мембран, что приводит к замедлению роста и развития, или даже гибели растения [2].

Целью работы было изучить влияние воздействия УФ-С на прорастание семян и уровень генерации АФК в клетках корня *Arabidopsis thaliana* и оценить эффективность антиоксидантов в снижении накопления АФК в ответ на обработку УФ-С. Объектом исследования являлись растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Использовались стандартизированные ростовые тесты с облучением проростков и семян УФ. Генерация АФК в корнях растений оценивалась с использованием флуоресцентного зонда дедроептидиум.

При облучении проростков *A. thaliana* УФ-С в течение 3 мин наблюдалось максимальное увеличение прироста корня (на 12,9 %), более длительное воздействие УФ ингибировало рост. При облучении УФ в течение 60 мин рост останавливался. Линия *gork1-1*, лишенная наружу-выпрямляющего K⁺-канала GORK, была менее чувствительной к УФ. Замена Цис-151 на Сер в АФК-чувствительном центре данного канала также делала растения более устойчивыми к обработке УФ в диапазоне времени 1-10 мин по сравнению с диким типом.

Облучение семян *A. thaliana* УФ оказывало стимулирующий эффект: длина корня при облучении 60 мин увеличилась на 14 %. Обработка растений УФ в течение 60 мин вызывала увеличение интенсивности флуоресценции ДГЭ в клетках корней арабидопсиса на 35%, что говорит о синтезе АФК. При добавлении антиоксидантов наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции ДГЭ по сравнению с воздействием УФ-С на корни, при этом наиболее эффективными антиоксидантами оказались тиомочевина и СОД, а также ингибитор НАДФН-оксидаз (DPI). Это говорит о том, что УФ в первую очередь стимулирует синтез высокоактивных

форм кислорода – гидроксильных и супероксиданионных радикалов, при этом НАДФН-оксидазы, вероятно, играют важную роль в усилении данного эффекта.

Работа выполнена в рамках задания ГПНИ (№ госрегистрации 20211734).

Библиографические ссылки

1. Hollósy, F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells // *Micron*. 2002. № 33. P. 179-197.

2. Зеленков В.Н., Лапин А.А., Латушкин В.В. и др. Влияние ультрафиолетового облучения на биохимические свойства растений // *Бутлеровские сообщения*. 2020. Т.63, №8. С. 134.

Модификация активности антиоксидантных ферментов и скорости окислительных процессов в растениях под действием пептидного элиситора AtPep1

Филипцова Г. Г.^{А*}, Гвоздь В. Д.^А

^А *Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: filiptsova@bsu.by*

Пептидные элиситоры растений (Pep) представляют собой группу сигнальных молекул, участвующих в формировании устойчивости растительных организмов к действию стрессовых факторов как биотической, так и абиотической природы. Восприятие растительной клеткой данных соединений способствует активации целого ряда защитных систем и индукции неспецифической устойчивости [1, 2]. Одним из ключевых процессов в сигналинге, вызванном пептидными элиситорами, является повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме, активация НАДФН-оксидазы и увеличение уровня активных форм кислорода (АФК) как в апопласте, как и в цитозоле клетки [3]. АФК, с одной стороны, являются сигнальными молекулами, с другой стороны, они могут вызвать окислительный взрыв. Ряд литературных данных свидетельствует, что генерация АФК под действием элиситоров способствует индукции фитоиммунитета [3, 4]. Важную роль среди указанной группы элиситоров играет пептид AtPep1, впервые выделенный у растений *Arabidopsis thaliana* [5]. К настоящему времени его аналоги обнаружены у различных видов растений из разных семейств. Целью данной работы было исследование влияния пептидного элиситора AtPep1 на активность антиоксидантных ферментов и скорость окислительных процессов в сельскохозяйственных растениях, подвергнутых действию окислительного стресса.

Установлено, что пептид AtPep1 в диапазоне концентраций 10^{-8} и 10^{-12} М оказывает элиситорное действие на растения руколы, латука, пшеницы, сои, гороха и вигны, выращенные в лабораторных условиях. Экзогенная обработка надземной части проростков данных культур приводит к увеличению их устойчивости к окислительному стрессу. Под действием элиситора происходит индукция сигнальных систем с участием АФК. Показано, что через 2 часа после обработки растений пептидом наблюдается повышение уровня АФК в листьях в 2,5–3 раза по сравнению с контролем. Увеличение времени воздействия пептида до 24 ч вызывает снижение данного показателя, через 48 ч после обработки он приближается к исходному уровню. Уменьшение содержания АФК обусловлено активацией антиоксидантных ферментов. Экспериментальные данные свидетельствуют, что под действием пептида AtPep1 происходит повышение активности пероксидазы примерно в 2 раза, а супероксиддисмутаза – до 4 раз по сравнению с контролем. Модификация редокс-статуса клеток, индуцированная пептидным элиситором AtPep1, приводит к увеличению устойчивости растений к последующему действию окислительного стресса. Показано, что в условиях стрессового воздействия в обработанных растениях происходит более быстрая активация антиоксидантных ферментов, и как следствие, снижение скорости перекисного окисления липидов.

На основании полученных данных можно предположить следующую схему действия AtPep1: пептид воспринимается растением и вызывает повышение уровня АФК в клетках, происходит индукция АФК-зависимых сигнальных путей и запуск защитных механизмов, в том числе активация антиоксидантных ферментов и снижение скорости окислительных процессов в растениях, подвергнутых окислительному стрессу.

Библиографические ссылки

1. Yamaguchi Y., Huffaker A. Endogenous peptide elicitors in higher plants // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2011. – V. 14. – P. 351–357.
2. Albert M. Peptides as trigger of plant defence // *J of Experimental Botany*. – 2013. – V. 64. – P. 5269–5279.
3. Ma Y. [et al.] Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca^{2+} -dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca^{2+} signal // *Plant Physiol*. – 2013. – V. 163. P. 1459–1471.
4. Moreau M. [et al.] NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? // *Physiol Plant*. – 2010. – V.138. – P. 372–383.
5. Huffaker A. Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response / A. Huffaker, A. Ryan // *PNAS*. 2007. V. 104, № 25. – P. 10732 – 10736.

Глутатион в антиоксидантной системе защиты в клубеньках бобовых растений

Цыганов В. Е.^{А*}, Иванова К. А.^А, Кусакин П. Г.^А, Цыганова А. В.^А

^А *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин 8, Россия. *E-mail: vetsyganov@arriam.ru*

Формирование азотфиксирующих клубеньков на корнях бобовых растений требует поддержание тонкого окислительно-восстановительного баланса клетки. Хотя у растений основным неферментативным антиоксидантом является аскорбиновая кислота, тиоловый трипептид глутатион также играет важную роль в формировании клубеньков. Глутатион синтезируется в две АТФ-зависимые стадии. На первой стадии, катализируемой γ -глутамилцистеинсинтетазой (кодируемой геном *GSH1*), из глутамата и цистеина синтезируется γ -Глу-Цис. На второй стадии к γ -Глу-Цис присоединяется глицин, она катализируется глутатионсинтетазой (кодируемой геном *GSHS*). У Бобовых наряду с глутатионом присутствует его гомолог – гомоглутатион, у которого глицин заменен на β -аланин. Синтез гомоглутатиона осуществляет гомоглутатионсинтетаза, кодируемая геном *hGSHS*. Значимая роль обоих тиолов в клубенькообразовании была показана для модельного бобового растения *Medicago truncatula* с использованием антисмысловых конструкций к *GSHS* и *hGSHS*, а также анализа транскрипционных профилей растений, обработанных специфическим ингибитором биосинтеза (гомо)глутатиона – L-бутионин-[S-R]-сульфоксимином (Иванова, Цыганов, 2017). Было выявлено, что на ранних стадиях формирования клубеньков необходимым условием становится наличие определенного пула обоих тиолов в растительных клетках для ингибирования защитных механизмов, индуцируемых салициловой кислотой, и колонизации ризобиями клеток макросимбионта. Снижение уровней глутатиона и гомоглутатиона снижало число клубеньков и уровни экспрессии маркерных генов ранних нодулинов *MtENOD12* и *MtENOD40*.

Была предположена роль глутатиона в стимуляции меристематической активности в клубеньках, поскольку максимальная концентрация глутатиона в клубеньке наблюдается в меристеме и зоне инфекции (Matamoros et al., 1999). Можно предположить, что флуктуации количества глутатиона в цитоплазме и ядре в клетках в зоне инфекции могут регулировать повторяющиеся раунды эндоредупликации инфицированных клеток. При исследовании роли (гомо)глутатиона в зрелых клубеньках *M. truncatula* было показано, что сверхэкспрессия гена *GSH1* в зоне азотфиксации приводила к увеличению содержания глутатиона, но не го-

моглутатиона, при этом наблюдалось повышение эффективности азотфиксации (El Msehli et al., 2011). Однако снижение уровня экспрессии *GSH1* привело к уменьшению эффективности азотфиксации и содержания обоих тиолов, а также размера клубеньков и экспрессии генов *TrxS1* (кодирует тиоредоксин) и *LEG* (кодирует леггемоглобин). Известно, что *TrxS1* влияет на дифференцировку бактериоидов через окислительно-восстановительное состояние цистеин-богатого пептида NCR335 (Ribeiro et al., 2017). Были выявлены различия в пространственной локализации экспрессии генов биосинтеза (гомо)глутатиона. Ген *GSH1* экспрессировался в меристеме, зоне инфекции и ранней зоне азотфиксации, *hGSHS* – в коре и проводящих пучках, *GSHS* – в коре и зоне азотфиксации (El Msehli et al., 2011). Анализ 73 видов Бобовых, представляющих 3 подсемейства, не выявил зависимость клубенькообразования от уровней накопления (гомо)глутатиона в тканях растений (Colville et al., 2015).

Таким образом, хотя на настоящий момент выявлена важная роль (гомо)глутатиона в развитии и функционировании симбиотических клубеньков, специфичность действия каждого из тиолов остается слабо изученной. Тем не менее, недетерминированные клубеньки (с меристемой, функционирующей продолжительное время) обычно содержат глутатион, в то время как в детерминированных клубеньках (с меристемой активной ограниченное время) преимущественно встречается гомоглутатион (Matamoros et al., 1999).

Недавно была изучена роль глутатиона (GSH), гомоглутатиона (hGSH) и их соотношения в развитии и функционировании симбиотических клубеньков, а также в защитных реакциях, сопровождающих неэффективное клубенькообразование у гороха (*Pisum sativum*) (Ivanova et al., 2022). Была использована панель симбиотических мутантов гороха, блокированных на различных стадиях развития симбиотических клубеньков: *sym33-3* (слабая аллель, «запертые» инфекционные нити, спорадический выход бактерий, проявление сильных защитных реакций) и *sym33-2* (сильная аллель, «запертые» инфекционные нити, проявление сильных защитных реакций), а также *sym40-1* (аномальные бактериоиды, окислительный стресс, раннее старение, активация защитных реакций). В результате проведенных исследований было выявлено, что соотношение глутатиона и гомоглутатиона в клубеньках выше, чем в неинокулированных корнях у всех анализируемых генотипов, причем наибольшее значение было обнаружено в клубеньках дикого типа. Более того, было показано, что переключение экспрессии генов в тканях клубеньков с *hGSHS* на *GSHS* происходит только после высвобождения бактерий из инфекционных нитей, приводя к увеличению соотношения глутатион : гомоглутатион. В неэффективных клубеньках мутантов соотношение глутатион : гомоглутатион

было различным и коррелировало со стадией развития клубенька. Изменение уровня обоих тиолов приводило к активации защитных реакций в клубеньках. Применение ингибитора биосинтеза глутатиона и гомоглутатиона

L-бутионин-[S-R]-сульфоксимида приводило к морфологическим нарушениям в зоне азотфиксации в клубеньках дикого типа, влияло на формирование симбиосом в клубеньках мутанта *sym40-1*, а также на функционирование меристемы и рост инфекционной нити в клубеньках мутанта *sym33-3*. Повышение уровня обоих тиолов после обработки глутатионом способствовало развитию инфекции и усилению защитных реакций в клубеньках мутанта *sym33-3*, тогда как аналогичное повышение в клубеньках мутанта *sym40-1* приводило к образованию инфицированных клеток, напоминающих азотфиксирующие клетки дикого типа, и исчезновению зоны раннего старения в основании клубенька. Между тем, повышение уровня гомоглутатина в клубеньках мутанта *sym40-1* в результате обработки глутатионом проявилось в виде ограничения инфекции, аналогичного тому, что наблюдалось в необработанных клубеньках мутанта *sym33-3*. Эти данные свидетельствуют о том, что для правильной симбиотической фиксации азота необходим определенный уровень тиолов и что изменения в содержании тиолов или соотношении глутатиона и гомоглутатиона связаны с различными нарушениями развития клубенька и активацией защитных реакций.

Работа поддержана Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2022-320 от «20» апреля 2022 г. грант НЦМУ «Агротехнологии будущего»).

Библиографические ссылки

1. Иванова К.А., Цыганов В.Е. Антиоксидантная система защиты в симбиотических клубеньках бобовых растений (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2017. 52(5): 878–894.
2. Colville L., Sáez C.M.B., Lewis G.P., Kranter I. The distribution of glutathione and homoglutathione in leaf, root and seed tissue of 73 species across the three sub-families of the *Leguminosae*. *Phytochemistry*, 2015, 115: 175-183.
3. El Msehli S., Lambert A., Baldacci-Cresp F., Hopkins J., Boncompagni E., Smiti S.A., Hérouart D., Frendo P. Crucial role of (homo)glutathione in nitrogen fixation in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.*, 2011, 192(2): 496-506.
4. Ivanova K.A., Chernova E.N., Kulaeva O.A., Tsyganova A.V., Kusakina P.G., Russkikh I.V., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. The regulation of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodule infection and defense responses by glutathione, homoglutathione, and their ratio // *Front. Plant Sci.* 2022, 13: 843565.
5. Matamoros M.A., Moran J.F., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M.C., Becana M. Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.*, 1999, 121: 879-888.

6. Ribeiro C.W., Baldacci-Cresp F., Pierre O., Larousse M., Benyamina S., Lambert A., Hopkins J., Castella C., Cazareth J., Alloing G., Boncompagni E. Regulation of differentiation of nitrogen-fixing bacteria by microsymbiont targeting of plant thioredoxin s1. *Curr. Biol.*, 2017, 27(2): 250-256.

Роль пероксида водорода (H_2O_2) в симбиотических клубеньках Бобовых

Цыганова А. В.^{А*}, Горшков А. П.^А, Цыганов В. Е.^А

^А *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия. *E-mail: avtsyganova@arriam.ru*

Активные формы кислорода (АФК) и азота, такие как супероксид-анион ($O_2^{\bullet-}$), пероксид водорода (H_2O_2) или оксид азота (NO), являются окислительно-восстановительными сигнальными молекулами, которые вырабатываются растениями в ответ на воздействия окружающей среды.

Одной из наиболее изученных АФК является пероксид водорода (Matamoros, Vescana, 2020). Многочисленные данные показали, что H_2O_2 играет важную роль у растений при абиотических и биотических стрессах. Он участвует во многих механизмах устойчивости, таких как укрепление клеточной стенки растений и продукция фитоалексинов. Также было показано, что H_2O_2 действует как сигнальная молекула, участвуя в регуляции широкого спектра процессов жизнедеятельности растений, таких как старение (Purro *et al.*, 2005; Matamoros *et al.*, 2013), фотодыхание и фотосинтез, движение устьиц, клеточный цикл, а также рост и развитие. Излишнее накопление H_2O_2 может привести к окислительному стрессу растения, который вызывает клеточную гибель. Рост и развитие растений во многом зависит от развития эффективного механизма, удаляющего H_2O_2 . Ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза, аскорбат пероксидаза и глутатион редуктаза, а также неферментные антиоксиданты — токоферолы, аскорбиновая кислота и глутатион совместно участвуют в детоксикации H_2O_2 . Поддержание концентрации H_2O_2 на соответствующем уровне может содействовать развитию растения и усиливать устойчивость к стрессам окружающей среды. Многочисленные исследования показали, что H_2O_2 не только сам является ключевой сигнальной молекулой в серии ответов, но и активирует множество других важных сигнальных молекул у растений (Ca^{2+} , салициловую кислоту, абсцизовую кислоту, жасмоновую кислоту, этилен, NO) (Desikan *et al.*, 2004; Purro *et al.*, 2005). Эти сигнальные молекулы функционируют совместно и играют комплексную роль при передаче сигнала во время роста, развития и устойчивости растений.

АФК, в том числе и пероксид водорода, продуцируются во время ризобияльной инфекции (Pauly *et al.*, 2006; Puppo *et al.*, 2013). Гены НАДФН-оксидазы, также называемые гомологами оксидазы респираторного взрыва (Rboh), были недавно идентифицированы и охарактеризованы в геномах различных Бобовых. Было показано, что RbohA и RbohB могут играть ключевую роль в успешной колонизации ризобий и правильном росте и форме инфекционных нитей, так как стимулируют необходимую продукцию АФК. В качестве потенциальных источников ферментативных АФК также рассматриваются пероксидазы III класса (Prx-III), их еще называют пероксидазами, индуцированными ризобиями (Rip1-10).

Nod-факторы, запускающие процесс клубенькообразования, могут активировать первую волну продукции АФК, участвующую в развитии клубеньков, и ингибировать вторую волну, участвующую в защитных реакциях (Cárdenas, Quinto, 2008). Первая волна модулирует экспрессию генов растений и/или окислительно-восстановительный статус белков, участвующих в деформации корневых волосков, росте инфекционной нити и формировании клубеньков (Cárdenas, Quinto, 2008; Puppo *et al.*, 2013).

Пероксид водорода непосредственно вовлечен в регуляцию роста за счет различных эффектов на эластичность клеточной стенки (Bell *et al.*, 2009). Корневые волоски и пыльцевые трубки растут за счет полярного типа роста клеток. Известно, что корневые волоски и пыльцевые трубки производят в растущем кончике АФК, необходимые для роста, так как перекисное сшивание белков клеточных стенок обеспечивают способность противостоять тургорному давлению. Кроме того, накопление АФК в корневых волосках колеблется во время роста и это сопровождается колебаниями pH, Ca^{2+} и скорости роста (Bell *et al.*, 2009).

Как и в случае других форм полярного роста клеток, рост инфекционной нити происходит в результате направленного отложения материала клеточной стенки и клеточной мембраны на кончике. При этом полярный рост инфекционной нити требует высокой степени координации между многими клеточными и внеклеточными процессами, включая динамику кальция, действие апопластных АФК, цитоскелета и везикулярного транспорта.

Prx-III, а также ризобияльные каталазы (Jamet *et al.*, 2007) способствуют упрочнению стенки и матрикса инфекционной нити (Wisniewski *et al.*, 2000). В процессе инфицирования продукция супероксид-аниона и H_2O_2 наблюдалась в инфекционных нитях и инфицированных клетках (Santos *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004; Цыганова и др., 2009). Была продемонстрирована динамика накопления пероксида водорода во время роста

инфекционной нити с отвердеванием клеточной стенки, а затем и ее матрикса (рис. 1) (Цыганова и др., 2009), что, возможно, способствует его затвердеванию в результате сшивания остатков тирозина в молекулах арабиногалактанпротеин-экстенсинов (рис. 1Г) (Brewin, 2004). Таким образом, во время роста инфекционной нити H_2O_2 способствует повышению жесткости инфекционной нити (Rathbun *et al.*, 2002; Purro *et al.*, 2013), а также выполняет сигнальную функцию (Pauly *et al.*, 2006; Purro *et al.*, 2013).

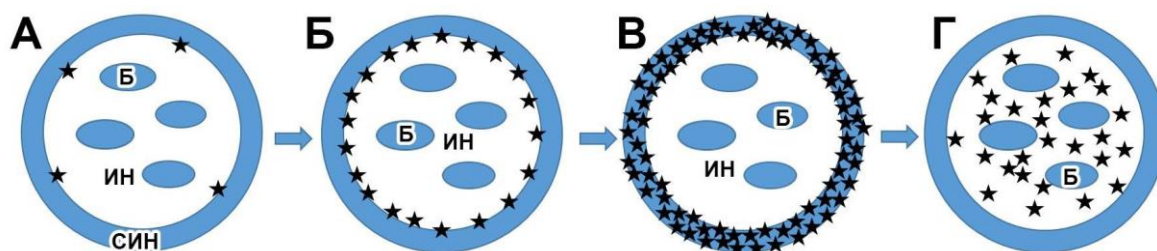


Рис. 1. Локализация H_2O_2 в инфекционных нитях в клубеньках гороха (*Pisum sativum* L.) дикого типа. (А) Начальные отложения H_2O_2 на внутренней поверхности стенки инфекционной нити. (Б) Сплошные отложения H_2O_2 на внутренней поверхности стенки инфекционной нити. (В) Полное пропитывание H_2O_2 стенки инфекционной нити. (Г) Появление H_2O_2 в матриксе инфекционных нитей и капель.

ИН — инфекционная нить, СИН — стенка инфекционной нити, Б — бактерия, черная звездочка — пероксид водорода.

При исследовании клубеньков *Pisum sativum* дикого типа была прослежена динамика накопления H_2O_2 и определены паттерны его распределения в различных зонах клубенька (рис. 2). Было продемонстрировано, что в меристеме и зоне инфекции накопление пероксида водорода происходит отдельными, немногочисленными каплями пергидроксида церия, располагающимися между плазматической мембраной и клеточной стенкой или стенкой инфекционной нити. В ранней зоне азотфиксации капли становились многочисленнее и мельче. С продвижением инфицированных клеток в зону азотфиксации клеточные стенки пропитываются мелкими кристаллами пергидроксида церия, которые становятся более многочисленными в зоне старения.

В клубеньках гороха дикого типа H_2O_2 был ассоциирован прежде всего со стенками инфекционных нитей и клеточными стенками, матриксом инфекционных нитей и капель, в то же время пероксид водорода не определялся в симбиосомах. Только в отдельных стареющих клетках наблюдалось накопление H_2O_2 вокруг деградирующих бактериоидов (рис. 2Г). Аналогичное распределение пероксида водорода в стареющих инфицированных клетках наблюдалось ранее в клубеньках люцерны, гороха,

сои, что подтверждает вовлечение H_2O_2 в процесс старения (Santos *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004).

Важную роль играет пероксид водорода в становлении и развитии защитных реакций растительных клеток при инфицировании ризобиями. Особенно яркое проявление защитных реакций с участием H_2O_2 было продемонстрировано для симбиотически неэффективных мутантов гороха (Цыганова и др., 2009).

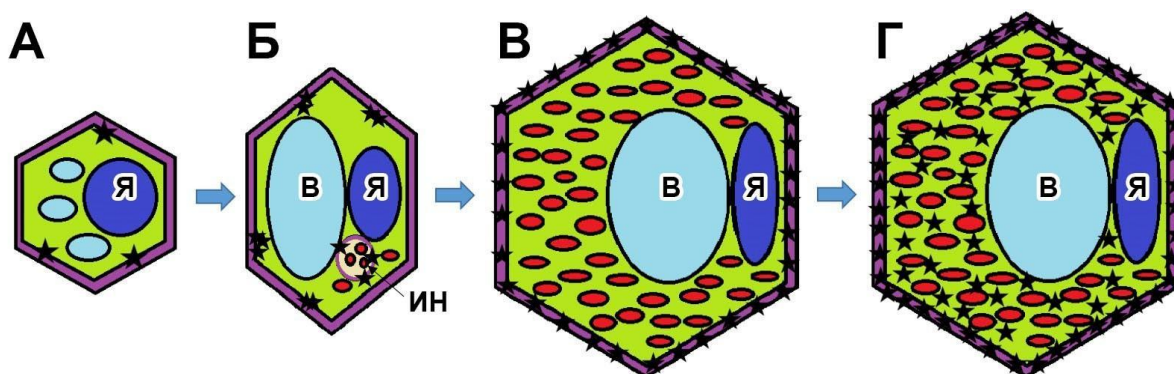


Рис. 2. Локализация H_2O_2 в клетках клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) дикого типа. (А) Появление H_2O_2 на внутренней поверхности клеточной стенки меристематических клеток. (Б) Отложения H_2O_2 в виде крупных капель на внутренней поверхности клеточной стенки и появление отложений пероксида водорода в стенке инфекционной нити в колонизированных клетках в зоне инфекции. (В) Появление мелких отложений H_2O_2 в толще клеточной стенки инфицированных клеток в зоне азотфиксации. (Г) Появление H_2O_2 в цитоплазме и вокруг дегенерирующих бактериоидов в стареющих инфицированных клетках в зоне старения. Я — ядро, В — вакуоль, ИН — инфекционная нить, черная звездочка — пероксид водорода

При изучении локализации и распределения пероксида водорода в клубеньках мутантов гороха по гену *Sym33*, характеризующихся утолщенными суберинизированными клеточными стенками и стенками инфекционных нитей (Ivanova *et al.*, 2015), а также наличием суберинизированного материала клеточной стенки в вакуоли, было продемонстрировано чрезмерное накопление пероксида водорода. Суберинизация является конечным процессом в детерминированных и высокодифференцированных растительных клетках. Макромолекулярная сборка полифенольных доменов при суберинизации происходит посредством H_2O_2 -зависимого процесса свободнорадикального связывания, опосредованного пероксидазой. H_2O_2 в клубеньках мутантов локализовался в виде мелких кристаллов пергидроксида церия в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей, а также в матриксе инфекционных нитей и инфекционных капель. Кроме того, были обнаружены везикулы, несущие материал клеточной стенки к плазматической мембране с кристаллами пергидроксида церия. Все это

может дополнительно свидетельствовать о развитых защитных реакциях у этих мутантов.

Для мутанта SGEFix⁻-1 (*sym40-1*) было характерно обильное накопление H₂O₂ в стенках инфекционных нитей, в матриксе гипертрофированных инфекционных капель, вокруг ювенильных бактериоидов и бактериоидов в мультибактероидных симбиосомах с формированием в дальнейшем аномальных бактериоидов (Цыганова и др., 2009). У мутанта Sprint-2Fix⁻ (*sym31*), характеризующегося недифференцированными бактериоидами, наблюдалось аномальное накопление мелких кристаллов пергидроксида церия в гетерохроматине ядра, чрезмерное накопление H₂O₂ в матриксе инфекционных нитей, а также вокруг деградирующих бактериоидов. Для мутанта RisFixV (*sym42*) было показано, что пероксид водорода накапливается вокруг преждевременно стареющих бактериоидов и в толще отложений каллозы в стенках инфекционных нитей и клеточных стенок. Такое аномальное распределение пероксида, вероятно, связано с активацией в этих мутантах сильных защитных реакций (Ivanova *et al.*, 2015). Отложение пероксида водорода вокруг бактериоидов наблюдалось и при обработке клубеньков различными тяжелыми металлами (Stambulska *et al.*, 2018).

Ранее было показано, что одним из возможных источников образования пероксида водорода в симбиотических клубеньках являются полиамины (путресцин, спермидин и спермин), которые служат субстратом для диаминооксидазы (ДАО) (Cona *et al.*, 2006). H₂O₂, генерируемый благодаря активности ДАО, может способствовать перекрестному связыванию гликопротеинов растительного матрикса инфекционных нитей, контролируя инфекцию ризобий (Wisniewski *et al.*, 2000).

Анализ локализации и распределения пероксида водорода в симбиотических клубеньках гороха, сформированных дефектными по биосинтезу полиаминов штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, показал, что, вероятно, некоторая часть H₂O₂ в клубеньках имеет бактериальное происхождение. Так в клубеньках, сформированных дефицитным по аргинину штаммом B918a-3841ArgC, количество преципитатов пергидроксида церия снижено как у линии дикого типа SGE, так и у мутанта SGEFix⁻-2 (*sym33-3*). Известно, что в растениях и бактериях существует путь образования путресцина из аргинина в реакции, катализируемой аргининдекарбоксилазой. Однако у ризобий основной путь синтеза путресцина происходит из орнитина с помощью орнитиндекарбоксилазы. Так у *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 в присутствии ингибитора орнитиндекарбоксилазы дифлуорметилорнитина уменьшался уровень путресцина и гомоспермидина на 95% и значительно снижался рост ризобий (Shaw *et al.*, 2010). В клубеньках *P. sativum*, инокулированных другим штаммом, дефи-

цитным по синтезу гомоспермидина B917-3841SpсВ, количество и распределение преципитатов пергидроксида церия не отличалось от такового при использовании эффективного штамма *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841.

Таким образом, выявлена динамика накопления пероксида водорода и определены закономерности ее локализации в различных зонах клубенька, на основании чего раскрыта роль пероксида водорода в росте инфекционной нити, связанном с увеличением жесткости стенки инфекционной нити, и в созревании клеточной стенки инфицированных клеток в процессе их дифференциации. Исследования, проведенные с использованием штаммов ризобий, дефицитных по синтезу полиамина (гомоспермидина) или его предшественника (аргинина), показали, что пероксид водорода, важный для формирования и функционирования симбиотических клубеньков, также может быть бактериального происхождения, а множественность путей синтеза полиамина предполагает взаимозаменяемость субстратов для образования пероксида водорода.

Работа финансово поддержана грантом РНФ 23-16-00090.

Библиографические ссылки

1. Bell E., Takeda S., Dolan L. Reactive oxygen species in growth and development // *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling* / Rio L. A., Puppo A. — Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. — P. 43-53.
2. Brewin N.J. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis // *Critical Reviews in Plant Sciences*. — 2004. — V. 23, № 4. — P. 293-316.
3. Cárdenas L., Quinto C. Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors // *Plant Signaling & Behavior*. — 2008. — V. 3, № 12. — P. 1101-1102.
4. Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. Functions of amine oxidases in plant development and defence // *Trends in Plant Science*. — 2006. — V. 11, № 2. — P. 80-88.
5. Desikan R., Hancock J.T., Neill S.J. Oxidative stress signalling // *Plant Responses to Abiotic Stress* / Hirt H., Shinozaki K. — Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. — P. 121-149.
6. Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations *sym40* (*PsEFD*), *sym33* (*PsIPD3/PsCYCLOPS*) and *sym42* // *Protoplasma*. — 2015. — V. 252, № 6. — P. 1505-1517.
7. Jamet A., Mandon K., Puppo A., Hérouart D. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis // *Journal of Bacteriology*. — 2007. — V. 189, № 23. — P. 8741-8745.
8. Matamoros M.A., Becana M. Redox control of the legume-Rhizobium symbiosis // *Advances in Botanical Research* / Frendo P. et al. Academic Press, 2020. — P. 67-96.
9. Matamoros M.A., Fernández-García N., Wienkoop S., Loscos J., Saiz A., Becana M. Mitochondria are an early target of oxidative modifications in senescing legume nodules // *New Phytologist*. — 2013. — V. 197, № 3. — P. 873-885.

10. Pauly N., Pucciariello C., Mandon K., Innocenti G., Jamet A., Baudouin E., Hérouart D., Frendo P., Puppo A. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume–*Rhizobium* symbiosis // *Journal of Experimental Botany*. — 2006. — V. 57, № 8. — P. 1769-1776.
11. Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M.M., De Felipe M.R., Harrison J., Vanacker H., Foyer C.H. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process // *New Phytologist*. — 2005. — V. 165, № 3. — P. 683-701.
12. Puppo A., Pauly N., Boscari A., Mandon K., Brouquisse R. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume–*Rhizobium* and mycorrhizal symbioses // *Antioxidants and Redox Signaling*. — 2013. — V. 18, № 16. — P. 2202-2219.
13. Rathbun E.A., Naldrett M.J., Brewin N.J. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2002. — V. 15, № 4. — P. 350-359.
14. Rubio M.C., James E.K., Clemente M.R., Bucciarelli B., Fedorova M., Vance C.P., Becana M. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2004. — V. 17, № 12. — P. 1294-1305.
15. Santos R., Hérouart D., Sigaud S., Touati D., Puppo A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2001. — V. 14, № 1. — P. 86-89.
16. Shaw F.L., Elliott K.A., Kinch L.N., Fuell C., Phillips M.A., Michael A.J. Evolution and multifarious horizontal transfer of an alternative biosynthetic pathway for the alternative polyamine *sym*-Homospermidine // *Journal of Biological Chemistry*. — 2010. — V. 285, № 19. — P. 14711-14723.
17. Stambulska U.Y., Bayliak M.M., Lushchak V.I. Chromium (VI) toxicity in legume plants: modulation effects of rhizobial symbiosis // *BioMed Research International*. — 2018. — V. 2018. — P. 8031213.
18. Wisniewski J.-P., Rathbun E.A., Knox J.P., Brewin N.J. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule Initiation by *Rhizobium leguminosarum* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2000. — V. 13, № 4. — P. 413-420.
19. Цыганова А.В., Цыганов В.Е., Борисов А.Ю., Тихонович И.А., Бревин Н.Д. Сравнительный цитохимический анализ распределения перекиси водорода у неэффективного мутанта гороха SGEFix⁻¹ (*sym40*) и исходной линии SGE // *Экологическая генетика*. — 2009. — Т. 7, № 3. — С. 3-9.

Влияние нанокompозитов хитозана и бактерий *Bacillus subtilis* на про/- антиоксидантную систему и устойчивость растений картофеля к инфицированию *Phytophthora infestans* и недостатку почвенной влаги

**Черепанова Е. А.^{А*}, Яруллина Л. Г.^А, Сорокань А. В.^А,
Заикина Е. А.^А, Бурханова Г. Ф.^А, Цветков В. О.^Б, Марданшин И. С.^Б,
Фаткуллин И. Я.^А, Пустовая А. Д.^Б, Калацкая Ж. Н.^Г.**

^А Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Уфа, 450054 Россия. *E-mail: k_cherepanova@mail.ru

^Б Уфимский университет науки и технологий, Уфа, 450076 Россия.

^В Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства УФИЦ
РАН, Уфа, 450059 Россия.

^Г Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск

Картофель является одной из основных продовольственных культур в мире. Однако растения одновременно или последовательно подвергаются различным абиотическим и биотическим стрессам, которые снижают урожайность и качество картофеля. Картофель является одной из наиболее чувствительных культур к недостатку влаги. Компоненты про- и антиоксидантной системы растений могут отражать адаптационную способность растений и служить маркерами устойчивости в условиях стресса. Помочь растениям преодолеть стрессовые воздействия помогают препараты, обладающие антистрессовым и иммуномодулирующим действиями.

В настоящее время первостепенной задачей растениеводства является уменьшение экологической нагрузки на среду обитания и разработка новых биопрепаратов для профилактики заболеваний и защиты растений от патогенов и абиотических стрессов. Хитин, хитозан и их олигомеры считаются активными элиситорами иммунитета растений. Преимуществами этих полисахаридов являются биосовместимость, нетоксичность и широкий спектр физиолого-биохимической активности. Использование бактерий, стимулирующих рост растений, также является одним из экологически чистых подходов к достижению устойчивого сельского хозяйства. Показано, что хитозан может быть использован для повышения биологической активности микробиологических препаратов на основе штаммов рода *Bacillus* (Amine et al., 2021). Однако существуют также трудности, связанные с включением хитозана в бактериальные питательные среды, поскольку он может подавлять рост бактериальной культуры из-за своей антимикробной активности, а также зависимости эффективности биопрепаратов от различных факторов окружающей среды. Введение но-

вых функциональных групп и заместителей, например, низкомолекулярных оксикоричных кислот (Варламов и др., 2020) позволяет создавать соединения на основе хитозана с улучшенными свойствами: антиоксидантными, антимикробными и др.

Механизмы влияния на растения получаемых в настоящее время конъюгатов на основе хитозана и оксикоричных кислот, а также нано- и субмикронных частиц на их основе только начинают изучаться. Следует отметить, что экспериментальные данные об иммуномодулирующем потенциале нано- и субмикронных частиц оксикоричных кислот в виде конъюгата с хитозаном, а также их взаимодействия с агрономически полезными микроорганизмами практически отсутствуют. Таким образом, значительный интерес представляет поиск и выяснение физиологических и молекулярных механизмов защитного и иммуностимулирующего действия новых нано- и субмикронных частиц на основе производных хитозана в комплексе с биологическими агентами на растения картофеля и повышение их устойчивости к возбудителям болезней и абиотическим стрессам.

В связи с этим целью нашей работы являлось изучение влияния обработки клубней картофеля сорта Удача наноконкомпозитами хитозана с феруловой и кофейной кислотами, а также бактерий *Bacillus subtilis* 26Д и их сочетанием с наноконкомпозитами хитозана на рост растений, устойчивость к инфицированию возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans*, компоненты про/антиоксидантной системы и их урожайность в нормальных условиях и при недостатке влаги в почве.

Методы. Для исследования были отобраны клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача башкирской селекции, полученных в Башкирском НИИСХ УФИЦ РАН (г. Уфа) – по 15 клубней на вариант опыта. Бактерии *B. subtilis* штамм 26Д и споры *Ph. infestans* были взяты из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Уфа, Россия). Конъюгаты хитозана с феруловой кислотой (Хит-ФК) были получены в Институте новых материалов НАН Беларуси.

Клубни опрыскивали растворами конъюгатов хитозана с феруловой кислотой (Хит-ФК), суспензией бактерий *B. subtilis* 26Д, конъюгатами Хит-ФК с бактериями 26Д. Контролем служили клубни, которые опрыскивали дистиллированной водой. Клубни сажали в открытый грунт, для создания нормальных условий выращивания влажность грунта поддерживали на уровне $75 \pm 5\%$ наименьшей влагоёмкости почвы, для имитации засухи с момента появления всходов влажность грунта поддерживали на уровне $55 \pm 5\%$.

Исследование устойчивости растений, выросших в открытом грунте, было проведено через 45 дней после их посадки методом искусственного инфицирования изолированных листьев. Для этого листья картофеля с двух верхних ярусов размещали в пластиковых кюветах, где создавались условия влажной камеры, затем инфицировали суспензией спор *Ph. infestans* 1840. На 10 сутки после инфицирования листья фотографировали и результаты обрабатывали в программе ImageJ.

В течение вегетации измеряли длину стеблей картофеля. В фазу бутонизации растений картофеля отбирали растительный материал для анализа концентрации белков, активности пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы, концентрации перекиси водорода в листьях. Пероксидазную и каталазную активности в супернатанте гомогената растительного материала определяли микрометодом (Veselova et al., 2019) при длине волны 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Концентрацию H_2O_2 при 560 нм по методу (Bindschedler et al., 2006) и оптическую плотность продукта реакции измеряли на люминесцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, США) при 560 нм. Активность супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1.) измеряли методом (Bonnet et al., 2000) на люминесцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, США) при 540 нм.

Содержание пролина в листьях картофеля определяли согласно (Yarullina et al., 2021) и продукт реакции измеряли на люминесцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, США) при 522 нм.

По окончании вегетации анализировали урожайность картофеля по количеству клубней, их среднему весу и термогравиметрическим методом определяли количество сухого вещества в клубнях.

Результаты. По результатам измерения длины стеблей картофеля было обнаружено, что в условиях нормальной влажности грунта наибольший ростстимулирующий эффект оказывали обработки *B.subtilis* 26Д + Хит-КК и *B.subtilis* 26Д + Хит-ФК, которые давали прибавку длины стеблей на 55% и 61% соответственно, по отношению к контрольным растениям. В условиях недостатка влаги в почве меньше всего замедлялся рост растений, обработанных Хит-ФК, он составил 98% от контроля, росшего в условиях нормальной влажности почвы, а у обработанных Хит-КК он даже был чуть больше, чем у контрольных растений, росших в условиях оптимальной влажности, и составил 107%. У обработанных *B.subtilis* 26Д + Хит-КК и *B.subtilis* 26Д рост стеблей был больше, чем у контроля, росшего в тех же условиях, но меньше, чем у контроля, росшего в условиях нормальной влажности почвы.

Искусственное инфицирование изолированных листьев (рис. 1) выявило, что площадь развития симптомов фитофтороза на листьях контрольных растений, растущих в условиях оптимальной увлажнённости почвы, достигала 80%, а у предобработанных конъюгатом хитозана с кофейной кислотой (Хит-КК) - чуть более 50%. Обработка конъюгатом хитозана с феруловой кислотой (Хит-ФК), как в отдельности, так и в смеси с *B. subtilis* 26Д, снижала степень поражения листьев картофеля до 20%. Сочетание *B. subtilis* 26Д совместно с Хит-КК было менее эффективным, и в этом случае симптомы фитофтороза в среднем развивались на 30% площади листьев, изолированных с растений, не испытывающих недостатка почвенной влаги.

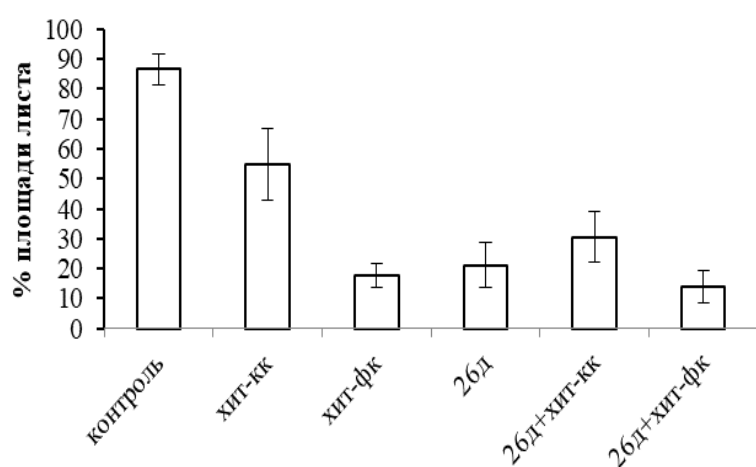


Рис. 1. Симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля Удача, обработанных биопрепаратами в полевых условиях при нормальной влажности почвы, через 10 суток после искусственного инфицирования *P. infestans*

Следует отметить, что на листьях, изолированных с растений, растущих при недостатке почвенной влаги (рис. 2), развитие симптомов заболевания фитофторозом замедлялось. В этом случае на листьях контрольных растений площадь симптомов составляла только 60% от всей листовой пластинки. При обработке конъюгатом Хит-КК площадь поражения листовой пластинки составляла 35%, при обработке Хит-ФК - 20%, а в случае смесей конъюгатов Хит-КК и Хит-ФК с *B. subtilis* – около 15 % площади листовой пластинки.

Известно, что накопление пролина говорит об уровне стрессоустойчивости растений. В нашем опыте максимальное накопление пролина наблюдалось в образце *B. subtilis* +Хит-ФК в условиях недостатка влаги, что говорит о том, что данная обработка повышает иммунный статус растения. В остальных изученных образцах уровень пролина незначительно отличался от значений в контрольных растениях.

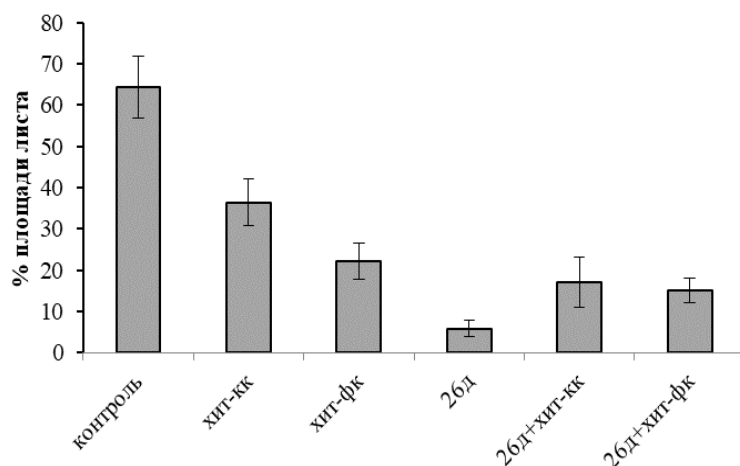


Рис. 2. Симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля Удача, обработанных биопрепаратами в полевых условиях при недостатке влаги в почве, через 10 суток после искусственного инфицирования *P. infestans*

При недостатке влаги в почве, обработанные Хит - КК растения картофеля отличались наибольшей активностью пероксидазы по сравнению с другими вариантами обработок. Каталазная активность при этом значительно повышалась в растениях, обработанных конъюгатами Хит-ФК. Обработка бактериями *B. subtilis* 26Д максимально стимулировала активность супероксиддисмутазы, что способствовало повышению концентрации перекиси водорода в растительных тканях. Растения, обработанные композитами Хит-КК или Хит-ФК совместно с *B. subtilis* в условиях почвенной засухи отличались значительным повышением активности каталазы по сравнению с другими вариантами, что, вероятно, способствовало подавлению развития окислительного стресса в растениях.

Анализ изоферментных спектров пероксидазы у растений, выращенных при недостатке влаги в почве, показал, что при обработке растений Хит-КК увеличивается активность анионной изопероксидазы картофеля при значительном снижении активности катионных изоформ. В обработанных Хит-ФК растениях активность всех изоформ пероксидазы была значительно ниже, чем в других вариантах обработки и в контроле. Ранее нами было замечено, что важное место в ответных реакциях картофеля на инфицирование возбудителем фитофтороза занимают катионные изопероксидазы, обладающие сродством к клеточным стенкам оомицета *Ph. infestans* (Максимов и др., 2011). Вероятно, защитное действие на растения картофеля к инфицированию *Ph. infestans* под воздействием *B. subtilis* 26Д в сочетании нанокompозитами хитозана связано со стимулирующим действием на активность катионных изоформ пероксидазы.

Такие параметры урожайности картофеля, как число клубней в гнезде и средний вес одного клубня наибольшими в условиях нормальной влажности были у растений, предобработанных композитами Хит-КК или Хит-ФК совместно с *B. subtilis* 26Д. Интересно отметить, что, как и в случае

длины стеблей, лучше всего абиотическому стрессу в виде почвенной засухи сопротивлялись предобработанные Хит-КК и Хит-ФК растения. Количество сухого вещества в клубнях было наибольшим у предобработанных Хит-КК + *B. subtilis* 26Д растений, росших в условиях нормальной влажности почвы, и у растений, предобработанных Хит-КК без добавления бактерий, росших в засушливых условиях.

Таким образом, обработка растений конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами, особенно при их сочетании с бактериями приводила к активации компонентов про-антиоксидантной системы (перекиси водорода, супероксиддисмутаза, каталазы, пероксидазы), а также увеличивала количество пролина, что повышает устойчивость растений к стрессам. Применение композитов хитозана с кофейной или феруловой кислотами в засушливом климате более благоприятно сказывается на адаптации растений к почвенной засухе, а добавление к этим препаратам *B. subtilis* 26Д оказывает положительное влияние на рост и урожайность картофеля, выращиваемого в условиях нормальной влажности почвы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-16-00139.

Библиографические ссылки

1. Amine R., Tarek C., Hassane E., Noureddine E.H., Khadija O. Chemical Properties of Biopolymers (Chitin/Chitosan) and Their Synergic Effects with Endophytic Bacillus Species: Unlimited Applications in Agriculture. *Molecules*. 2021. V. 26. P. 1117
2. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи биологической химии*. 2020. Т.60. С. 317–368
3. Veselova, S.V.; Burkhanova, G.F.; Rumyantsev, S.D.; Blagova, D.K.; Maksimov, I.V. Strains of Bacillus spp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019, 55, 41–47
4. Bindschedler, L.V.; Dewdney, J.; Blee, K.A. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *Plant J.* 2006, 47, 851–863
5. Bonnet M., Camares O., Veisseire P. // *J. Experimental Botany*. – 2000. – V. 51. – P. 945–953
6. Yarullina, L.G.; Burkhanova, G.F.; Cherepanova, E.A.; Sorokan, A.V.; Zaikina, E.A.; Tsvetkov, V.O.; Mardanshin, I.S.; Kalatskaya, J.N.; Balyuk, N.V. Effect of Bacillus subtilis and signaling molecules on the state of the pro/antioxidant system and the expression of protective protein genes in potato plants upon phytophthora and a moisture deficit. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2021, 57(6), 760-769.
7. Максимов И. В., Сорокань А. В., Черепанова Е. А., Сурина О. Б., Трошина Н. Б., Яруллина Л. Г. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на компоненты про-/антиоксидантной системы в растениях картофеля при фитофторозе // *Физиология растений*. – 2011. – Т. 58. – №. 2. – С. 243 – 251.

**Особенности модификации ростовых процессов протокормов
Phalaenopsis в культуре *in vitro* под действием экзогенных
брассиностероидов**

**Черныш М. А.^{А*}, Бахметова А. Ф.^А, Стромская Т. С.^А,
Жабинский В. Н.^Б, Хрипач В. А.^Б, Демидчик В. В.^А**

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: chernyshmaryia@gmail.com

^Б Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.

Контроль роста и развития растений при культивировании *in vitro* главным образом осуществляется содержанием фитогормонов в среде, а также их соотношением. В большинстве случаев для биотехнологических манипуляций *in vitro* используются цитокинины и ауксины [1]. В последнее время появились работы, указывающие на возможность применения в качестве регуляторов роста и других соединений. В частности, высокую эффективность демонстрируют стероидные фитогормоны – брассиностероидов (БС) [2, 3]. Показано, что экзогенная обработка умеренными дозами БС повышает устойчивость растений к стрессовым воздействиям, таким как засуха, засоление, воздействие тяжелых металлов, а также различных патогенов [4, 5], что, вероятно, происходит вследствие их влияния на накопление АФК, свободно-радикальные процессы, воздействия на специфические белки-мишени и факторы транскрипции, контролирующие иммунитет растений и пути биосинтеза стрессовых гормонов. Однако возможность применения данных фитогормонов для управления ростовыми процессами в условиях *in vitro* исследована недостаточно. Так, потенциальное воздействие БС на физиологические процессы у Орхидных – крупнейшего семейства покрытосеменных растений, насчитывающего порядка 30000 видов [6], остаются практически неизученными.

Целью настоящей работы было изучение особенностей воздействия шести основных БС: брассинолида, кастастерона, 24-эпикастастерона, 28-гомокастастерона, 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассинолида на рост протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в культуре *in vitro*.

Перспективной технологией культивирования орхидей является размножение семенами в стерильных условиях через культуру протокормов – уникальных по анатомии структур орхидных, которые развиваются непосредственно из прорастающих семян [7]. Культура протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume была получена через посев семян из цельных нераскрывшихся коробочек. Данный метод позволяет использовать более опасные стерилизующие вещества, что значительно облегчает введение семян в культуру [8]. Стерилизация коробочек *Phalaenopsis* осу-

ществлялась посредством трехкратной обработки 70% этанолом с последующим обжигом в пламени спиртовки. После стерилизации семена из коробочек засевались на поверхность питательной среды. Использовалась агаризованная среда Fast [9], 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 (pH = 5,5). Протокормы, полученные из первичной культуры, переносились на среды, содержащие различные БС в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-6} М и ростовые параметры протокормов анализировались через 100 сут.

Введение в среду БС во всем диапазоне протестированных концентраций вызывало значительное усиление ростовых процессов, что выражалось в увеличении длины и приросте биомассы орхидей. Наибольший стимулирующий эффект на длину растений наблюдался при добавлении в среду брассинолида (рис. 1А). При концентрации брассинолида 10^{-7} М наблюдалось двукратное увеличение длины растений по сравнению с контрольными образцами.

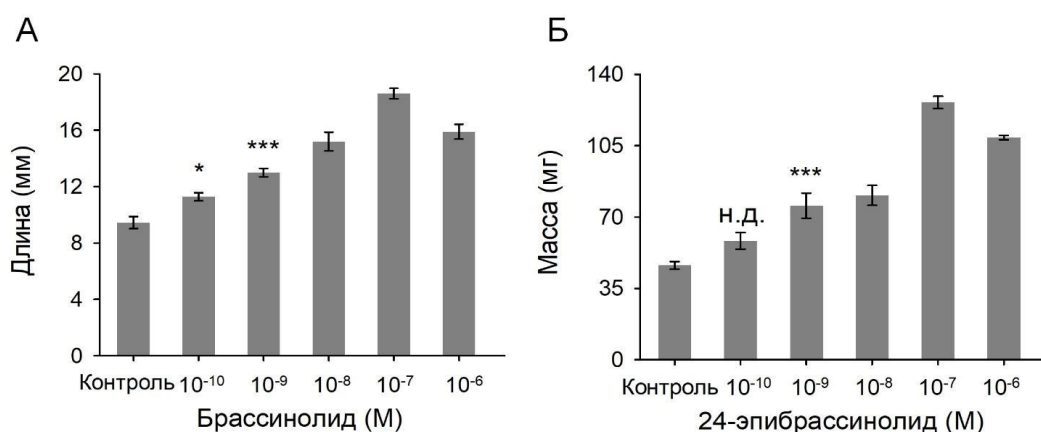


Рис. 1. Эффект 10^{-10} – 10^{-6} М брассиностероидов на ростовые параметры микрорастений *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume: А – длина растений, сформировавшихся из протокормов на 100 сут культивирования на среде с брассинолидом; Б – масса растений на 100 сут выращивания на среде с 24-эпибрассинолидом ($X \pm S_x$; n = 10; * – $p < 0,01$; *** – $p < 0,0001$)

Наибольшим стимулирующим воздействием на прирост биомассы обладал 24-эпибрассинолид (рис. 1Б). При концентрации 10^{-7} М данного фитогормона в среде масса растения увеличивалась в 2,7 раза по сравнению с контролем. Кастастерон и 24-эпикастастерон также демонстрировали высокую эффективность по отношению к длине растений. Сравнение эффектов БС и ауксинов показало, что стероидные гормоны оказывают схожее либо в некоторых случаях даже более сильное стимулирующее воздействие, чем ауксины. При сочетанном воздействии БС и ауксинов

обнаружено подавление стимулирующего эффекта, наблюдаемого при введении фитогормонов по отдельности.

Таким образом, в настоящей работе было показано, что введение БС (10-10 – 10-6 М) в среду культивирования вызывает стимуляцию ростовых процессов у протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume, в связи с чем БС могут быть использованы для оптимизации культивирования декоративных орхидей *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в условиях *in vitro*.

Библиографические ссылки

1. Pierik R.L.M. *In vitro* culture of higher plants / Springer Science + Business Media, B.V., 1997. – 348 p.
2. Khripach, V.A. Brassinosteroids: a new class of plant hormones / V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii, A.E. de Groot // Academic Press: San Diego, USA, 1999. – P. 456.
3. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development / D. Steven [et al.] // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1998. – Vol. 49. – P. 427-451.
4. Brassinosteroids: multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses / T.M. Nolan [et al.] // Plant Cell. – 2020. – Vol. 32. – P. 295-318.
5. Exogenous brassinosteroids promotes root growth, enhances stress tolerance, and increases yield in maize / H. Zhang [et al.] // Plant Signal. Behav. – 2022. – Vol. 17. – 2095139.
6. Черевченко, Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М. Черевченко, А.Н. Лаврентьева, Р.В. Иванников; под ред. Ж.В. Загоруйко. – Киев: Наук. Думка, 2008. – 560 с.
7. Yeung, E.C. A perspective on orchid seed and protocorm development / E.C. Yeung // Bot. Stud. – 2017. – Vol. 58. – P. 33.
8. Clonal propagation of orchids / D. Jones [et al.] // Methods Mol. Biol. – 1990. – Vol. 6. – P. 181-191.
9. Fast, G. *Orcideen kultur* / G. Fast. – Stuttgart: Ulmer, 1980. – 460 p.

Белки теплового шока как ранние маркеры окислительного стресса у растений

Юрина Н. П.^{А*}, Олескина Ю. П.^А, Муртазина Н. Д.^А

^А *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия.*

**E-mail: nyurina@inbi.ras.ru*

Воздействие глобальных изменений климата на растения имеет серьезные последствия для биоразнообразия экосистем и продовольственной безопасности. Адаптация растений к стрессам окружающей среды представляет собой сложный процесс, включающий как физиологические, так и биохимические и молекулярные механизмы. В условиях биотического и абиотического стресса в клетках растений образуются активные формы

кислорода (АФК), вызывающие разрушительный окислительный стресс. В то же время АФК выполняют дополнительные сигнальные функции в адаптации растений к стрессу. Для мониторинга повреждающего действия окислительного стресса, вызванного действием окружающей среды, и для отбора устойчивых генотипов необходимо раннее выявление стрессового воздействия на организмы. Постоянно продолжается поиск различных типов маркеров окислительного стресса. Маркеры окислительного стресса растений можно определить как молекулы, которые изменяются при взаимодействии с АФК в стрессовых условиях. Во многих исследованиях гены, индуцируемые АФК, были идентифицированы как маркеры. Воздействие на растения теплового стресса и/или засухи приводит к образованию избытка АФК, повреждению клеток и окислительному стрессу, которые ингибируют биосинтез обычных клеточных белков и запускают синтез стрессовых белков, препятствующих окислительному стрессу.

Первой линией защиты растений, подвергшихся действию стрессов, является шаперонная система клетки. У растений и животных выделяют пять основных консервативных семейств белков теплового стресса (HSP) на основе их молекулярной массы, такие как HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 и малые HSP (sHSP) [1, 2]. HSP помогают организмам противостоять стрессу, действуя как молекулярные шапероны, помогающие предотвратить неправильное сворачивание белков и добиться правильного сворачивания неправильно свернутых белков, что облегчает функционирование и выживание клеток в условиях стресса [1]. Многие из этих HSP в основном локализованы в цитоплазме, реагируют на абиотические и биотические стрессы и в условиях стресса участвуют в передаче клеточных сигналов ядру. Помимо цитоплазмы, HSP шапероны обнаружены и в других компартментах клетки, таких как ЭПР, хлоропласт митохондрии и ядро, что предполагает их различные функции в белковом гомеостазе [3], но также на биотические стрессы, такие как инфекция патогенов и атаки насекомых. Они являются универсальными защитными белками при стрессовом воздействии на растения.

Среди семейств HSP показана жизненно важная роль шаперонов HSP70 в реакциях как на абиотические, так и на биотические стрессы. Недавно появились сообщения о более высоком уровне экспрессии HSP70 у устойчивых к болезням подсолнечников, по сравнению с восприимчивыми растениями [4]. Обнаружено, что повышенные уровни HSP70 связаны с устойчивостью к засухе у ряда видов растений рис, *Arabidopsis*, табак, сахарный тростник и хризантемы. Известно, что Hsp70 предпочтительно связывается с несвернутыми или частично свернутыми белками и предотвращает их агрегацию или неправильный фолдинг. Номенклатура

различных белков семейства Hsp70 обширна и основана на клеточном распределении и индуцируемости. У высших растений существует не менее 18 генов семейства Hsp70, которые кодируют группу близких белков с молекулярной массой от 71 до 99 кДа [2, 3]. Базовый уровень экспрессии и индуцибельность в ответ на разнообразные виды стресса различаются для множества членов этого семейства.

В настоящее время свойствам и функциям белков теплового шока в живых организмах посвящено большое количество научных работ, проводимых в разных странах мира. Большинство исследований проводится на белках теплового шока цитоплазмы, в то время как белки хлоропластов изучены намного меньше. Особый интерес представляет изучение белков HSP70B хлоропластов в связи с их важной ролью в защите фотосинтетического аппарата. Интерес к шаперонам, скорее всего, будет лишь возрастать - настолько необычными, незаменимыми и важными для жизни растений являются, как показывают исследования, эти белки [1, 2].

В работе мы изучали динамику уровней шаперонов HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов при тепловом стрессе у трех видов тыквы с разной устойчивостью к стрессам, которые могли бы использоваться в качестве ранних маркеров окислительного стресса. Проростки трёх видов тыквы (*Cucurbita moschata* Duchesne, сорт Витаминная; *Cucurbita pepo* L., сорт Кустовая оранжевая; *Cucurbita maxima* Duchesne, сорт Мраморная) выращивали в течение двух недель. Молодые растения делили на две группы – контрольную и опытную, последнюю подвергали воздействию теплового стресса (при температуре 38 °C, 2 ч). Выделенный из растений суммарный белок анализировали с помощью электрофореза и последующего иммуноблоттинга. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела к белку теплового шока цитоплазмы (HSP70) (Agrisera, AS08 371), в разведении (1:3000), антитела к HSP70B хлоропластов любезно предоставлены проф. M. Schroda, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg в разведении (1:5000). В качестве вторичных антител использовали козьи анти-кроличьи иммуноглобулины (IgG), конъюгированные с пероксидазой хрена (Agrisera, AS10 668), в разведении (1:10000). Для проверки правильности нанесения белков на гель были использованы антитела к большой субъединице Рубиско (RbcL) (фирма Agrisera, AS03 037) в разведении (1:5000). Для определения иммобилизованных антигенов использовали высокочувствительный метод иммунодетекции ECL (enhanced chemiluminescence). Полученные фотографии обрабатывали при помощи программы ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). После чего данные обрабатывали в программе Excel.

Установлена взаимосвязь между содержанием белков теплового шока HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов и видовой принадлежностью растений тыквы в условиях теплового стресса. Обнаружено, что по сравнению с нормальными условиями в условиях теплового стресса уровень белков HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов у *C. pepo* и *C. maxima* повышен, тогда как уровни этих белков у тыквы *C. moschata* снижены. При тепловом стрессе отмечено значительное повышение уровней белков теплового шока в клетках растений тыквы *C. maxima* – уровень HSP70 в цитоплазме возрос в 3.6 раза, а уровень HSP70B хлоропластов – в два раза. Тепловой стресс вызывал увеличение в 1.7 раза уровень цитоплазматического шаперона HSP70 в клетках растений тыквы *C. pepo*, а значимого изменения уровня белка HSP70B не отмечено. В результате действия теплового стресса на растения тыквы *C. moschata* выявлено уменьшение уровней HSP70 и HSP70B по сравнению с необработанными растениями. Увеличение уровней HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов в клетках растений тыквы *C. maxima* говорит о её способности активно противостоять тепловому стрессу и выжить в неблагоприятных условиях. Изучение уровней шаперонных белков HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов у трех видов тыквы обнаружило, что этот белок может служить ранним маркером окислительного стресса и стрессового состояния клеток. Это согласуется с гипотезой о том, что белки теплового шока семейства HSPs70 являются одними из основных компонентов устойчивости к стрессам [2].

В качестве маркеров окислительного стресса используются представители разных семейств HSP. Особый интерес вызывают представители семейства малых белков теплового шока sHSP, так как они часто являются наиболее ранними и интенсивно синтезируемыми стрессовыми белками и могут также служить маркерами стресса [2, 5]. Так, например, изучена возможность использования sHSP17.4CI *Arabidopsis* в качестве маркера окислительного стресса [5]. Участие АФК в индукции HSP17.4C показано в опытах, в которых растения обрабатывали пероксидом водорода. Установлено, что такая обработка повышала уровень экспрессии генов HSP17.4C [5]. Это предполагает, что быстрая индукция и высокая экспрессия гена *HSP17.4CI* при различных стрессовых состояниях, сопряженная с образованием АФК, может играть важную роль в снижении окислительного стресса, а HSP17.4CI применяться в качестве маркера окислительного стресса у *Arabidopsis*. Чрезмерная экспрессия генов семейства sHSP и HSP70 в стрессовых условиях, приводящая к избыточному содержанию HSP, может быть использована в качестве индикатора окислительного стресса и реакции организмов на стресс.

Анализ полученных нами данных показал, что существует обратная зависимость между конститутивным уровнем белков теплового шока у растений трех видов тыквы и индуцированным уровнем шаперонов после действия теплового стресса. Показано, что более высокие конститутивные уровни белков теплового шока в клетках *Cucurbita* коррелировали с более низкой индукцией HSP70 и HSP70B после воздействия стресса. По-видимому, для устойчивых к тепловому стрессу растений в большей степени важен высокий показатель уровня индукции белков теплового шока, чем более высокий конститутивный уровень шаперонных белков. Предполагают, что высокий уровень HSP обусловлен конститутивно экспрессирующимися HSP70, которые участвуют в поддержании жизненной активности клеток в нормальных условиях, а индуцированные белки HSP это те белки, которые участвуют в защите от окислительного стресса, вызванного тепловым или другими видами стресса. На основании этих результатов можно предположить, что индукция этих белков может рассматриваться как клеточный компенсаторный механизм.

Сходные результаты были получены для клеток зеленых водорослей, выросших в экстремальных условиях Антарктики. В клетках антарктических видов водорослей обнаружен повышенный уровень конститутивных HSP70 цитоплазмы [6] и HSP70B хлоропластов [7]. Однако тепловой стресс не вызывал у этих водорослей дальнейшего увеличения содержания белков теплового стресса. По-видимому, клетки теряли способность к дополнительному накоплению HSP или был достигнут максимальный уровень этих шаперонов в клетке.

Таким образом, установлена взаимосвязь между содержанием белков теплового шока HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов и видовой принадлежностью растений тыквы в условиях теплового стресса. Показано, что динамика изменения уровней шаперонов цитоплазмы и хлоропластов при действии теплового стресса аналогичная.

К настоящему времени проведен обширный биоинформатический анализ семейств генов *HSP70* в стрессовых условиях, а также при развитии и росте растений. Анализ полностью секвенированный геномов ряда растений позволил обнаружить все предполагаемые гены белков теплового шока, их дублирование и разнообразие, изучить структуру генов – консервативных сайтов, специфических мотивов, интронов, экзонов, сайтов связывания с различными лигандами, а также провести филогенетический анализ и распределение генов *HSP* на хромосомах [3]. У высших растений в отличие от водорослей обнаруживается избыточное число генов *HSP70*. Полагают, что эти гены образовались в результате дупликации. Функции этих избыточных генов *HSP70* еще предстоит изучить. Растения, как ор-

ганизмы, которые не способны передвигаться и избегать стрессов, обладают развитыми механизмами защиты для выживания или адаптации к стрессовым условиям. Например, эволюционный анализ показал, что растения имеют в 3-4 раза больше генов белков, стрессового ответа, например, таких как белки теплового шока, чем другие организмы, в результате дупликации всего генома [3]. Биоинформатический анализ промоторной области показал присутствие различных цис-регуляторных элементов в (up-stream) области перед генами HSP70 цитоплазмы, таких как элементы, реагирующие на стресс и гормоны. Все это указывает на потенциальную роль генов этого семейства в устойчивости к стрессовым воздействиям [2, 3]. Необходимо дополнительное изучение функций этих идентифицированных с помощью генетического анализа большого числа HSP70 белков.

Использование методов генетической инженерии и геномного редактирования позволяет использовать гены белков HSP для повышения устойчивости растений к стрессовым условиям. Так, сверхэкспрессия цитоплазматических генов HSP70-1 HSP70-2 перца *Capsicum annuum* в трансгенных клетках *Arabidopsis* привела к повышенной термотолерантности у *Arabidopsis* [8]. Эти данные иллюстрируют большое значение HSP для отбора и создания продуктивных сортов растений. Механизм ответа клеток растений на тепловой стресс представляет собой сложную систему, и несомненное участие HSP70 в механизме термотолерантности нуждается в дальнейшем изучении.

Полученные нами результаты указывают на то, что HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов являются не только защитными белками клетки, но могут служить и ранними маркерами окислительного стресса. Основываясь на полученных нами данных и биоинформатическом анализе, можно заключить, что HSP70 цитоплазмы и белок HSP70В хлоропластов *Cucurbita* представляют больший интерес для практических целей. Это согласуется с ранее опубликованными данными о ключевой функции HSP70 в реакциях растений на стрессовые условия [3]. Разнообразная роль представителей семейства HSP70 в условиях теплового стресса и засухи дает информацию для дальнейшего изучения функций представителей этого важного семейства шаперонных белков, особенно в стрессовых условиях.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (Грант № 23 24 00486).

Библиографические ссылки

1. Al-Whaibi M.H. J. King Saud Univ.-Science. 2011. V. 23. P. 139–150. doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022
2. Юрина Н.П. // Молекулярная биология. 2023. Т. 57. С. 949–964. doi: 10.31857/S00 M26898423060228
3. Davoudi M., Chen J., Lou Q. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. 1918. doi: 10.3390/ijms23031918.
4. Kallamadi P.R., Dandu K., Kirti P.B., Rao C.M., Thakur S.S., Mulpuri S. // Proteomics. 2018. V. 18. 1700418. doi: 10.1002/pmic.201700418
5. Sewelam N., Kazan K., Hüdig M., Maurino V.G., Schenk P.M. (2019) Int. J. Mol. Sci. 20, 3201. doi:10.3390/ijms20133201
6. Cvetkovska M., Zhang X., Vakulenko G., Benzaquen S., Szyszka-Mroz B., Malczewski N., et al.. // Plant, Cell & Environment. 2022. V. 45. P. 156-177. doi.org/10.1111/pce.1420
7. Chankova S., Mitrovska Z., Miteva D., Oleskina Y.P., Yurina N.P. // Gene. 2013. V. 516. P. 184–189. dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.052
8. Guo M., Liu J.-H., Ma X., Zhai Y.-F., Gong Z.-H., Lu M.-H. // Plant Sci. 2016. V. 252. P. 246–256. dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.07.001

Активность пероксидазы в растениях семейства *Cucurbitaceae* при гипотермии

Яковец О. Г.^{А*}, Занько Д. И.^А

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь, *E-mail: yakovets@inbox.ru

Пероксидаза является индуцибельным ферментом, индуктором которого могут служить физические, химические и биологические факторы. В последние время появляется большое количество научных работ, в которых исследователи предлагают использовать различные ферменты, в том числе пероксидазы, как диагностический признак для оценки степени устойчивости растений к действию стрессовых факторов. Считается, что возрастание активности фермента может свидетельствовать о защитных реакциях растительного организма на действие неблагоприятных факторов окружающей среды. Учитывая все это, нами на основе динамики пероксидазной активности была проведена сравнительная оценка устойчивости растений *Cucurbita pepo*, *Cucurbita pepo* L.var.giraumonas, *Cucumis sativus* L. к гипотермическому воздействию.

В качестве объекта исследований использовались проростки тыквы обыкновенной сорта Золотая корона, кабачка-цуккини Тондо ди Пьяченца Р2, огурца обыкновенного Цезарь F1 в стадии 2-3 настоящих листьев, выращенные в сосудах с вермикулитом. Условия гипотермии создавались путем помещения проростков в хладотермостат при температуре +4°C на

0,25, 0,5, 0,75, 1, 24 ч. Активность пероксидазы (АП) определяли по методу Бояркина по скорости окисления бензидина.

После 0,25ч-воздействия гипотермии выявлен достоверный рост активности данного антиоксидантного фермента только у проростков огурца (в 4,8 раза). При увеличении времени гипотермического воздействия до 0,5ч наблюдалось достоверное увеличение АП у огурца и тыквы в 1,4 и 1,3 раза, соответственно; АП у проростков кабачка достоверно не изменялась по сравнению с контролем. Однако, после 0,75ч-гипотермического воздействия пероксидазная активность у проростков тыквы достоверно уменьшалась в 5,6 раза, а у проростков огурца – достоверно увеличивалась в 4,7 раза, активность фермента у проростков кабачка достоверно не изменялась по сравнению с контролем. АП после 1ч-гипотермии достоверно возрастала у тыквы и огурца в 3,4 и 10,5 раз, соответственно; активность фермента у кабачка достоверно не отличалась от контрольной величины АП после 24ч-гипотермии достоверно уменьшалась у проростков тыквы в 5,2 раза, у проростков кабачка – в 2,0 раза, а у проростков огурца – достоверно увеличивалась по сравнению с контролем в 2,0 раза.

Таким образом, можно заключить, что из исследованных тыквенных культур наибольшей устойчивостью к действию низких положительных температур обладает огурец, а наименьшей кабачок, тыква занимает промежуточное положение.

Функционирование устьичного аппарата *Pisum arvense* при обработке растений наночастицами оксида меди

Яцзин Ш.^А, Пшибытко Н. Л.^{А*}, Демидчик В. В.^А

^А Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: Pshybytko@bsu.by

Применение нанотехнологий в сельском хозяйстве увеличивается с каждым годом. Традиционные крупнотоннажные удобрения уступают место наноудобрениям из-за высокой стоимости и возможного вредного воздействия на окружающую среду. Это способствует поиску экологически чистых удобрений или «умных» удобрений с высокой эффективностью. Особое внимание уделяется наночастицам оксидов металлов, особенно CuO. Медь широко распространена в тканях растений, является важным микроэлементом для роста и участвует во многих физиологических процессах. Вопрос о возможных способах проникновения наночастиц в растительный организм, а также механизмах их дальнейшего перемещения по тканям и клеткам растений является на сегодняшний день наиболее спорным. Основным способом проникновения наночастиц через листья

рассматривают устьица. Поэтому аппертура устьиц, а также их способность открываться и закрываться определяет реакцию растений на обработку наночастицами, а также способность растительных организмов адаптироваться к изменяющимся условиям среды, адаптировать водный обмен и фотосинтетическую активность.

Целью данной работы являлось исследование влияния наночастиц оксида меди на функционирование устьичного аппарата *Pisum arvense* L. Состояние устьичного аппарата анализировалось через 1-24 ч после обработки (путем опрыскивания) наночастицами CuO (0,1; 1; 10; 100; 1000 мг/мл) сферической формы размером 40-50 нм с использованием инвертированного микроскопа Nikon Diaphot TMD (x400) при слабом освещении (~ 40 $\mu\text{моль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). Для максимального открытия устьиц использовалось освещение ($\sim 1\,000$ $\mu\text{моль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) от источника однородного холодного света Zeiss KL 1500 LCD (цветовая температура освещения 2900 K) в течение 20 минут. Показано, что ширина устьичной щели растений гороха полевого при слабом освещении увеличивалась на $56,7 \pm 5,4\%$ через час после обработки раствором наночастиц CuO, а затем постепенно уменьшалась. Повышение концентрации наночастиц CuO усиливало ингибирующий эффект обработки. Скорость светового открытия устьиц в контрольных растениях гороха полевого составляла $14,5 \pm 0,7$ устьиц/мин. Через час после обработки растений суспензией наночастиц оксида меди (0,1 мг/мл) данный показатель снижался на $20,1 \pm 3,8\%$. Ингибирующий эффект наночастиц сохранялся в течение суток. Обработка высокими концентрациями наночастицами CuO (1000 мг/мл) оказывала более выраженный и более длительный эффект. В этом случае уже через час после обработки растений наночастицами скорость светового открытия устьиц составляла $6,3 \pm 0,4$ устьиц/мин, что составляло $43,4 \pm 4,1\%$ от уровня контрольного варианта.

На основании полученных данных можно заключить, что наночастицы CuO оказывают негативное влияние на работу устьичного аппарата гороха полевого, снижая аппертуру устьиц и замедляя их световое открытие, тем самым нарушая нормальный процесс транспирации и газообмена.

Работа выполнена в рамках задания 2.04.5 «Установление закономерностей токсического воздействия металлосодержащих нанополлютантов атмосферы на физиологические процессы у высших растений» ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021-2025 годы (№ ГР 20211705)

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Basnet A.C., 8
Beckett R.P., 7, 97, 208
Birkemeyer C.D., 9
Duc N.V., 9
Frolova N., 8, 9
Herfurth U.M., 9
Pashkovskij P.A., 8
Schat H., 252
Tarakhovskaya E., 8
Vereshchagin M., 8
Абилова Г.А., 11
Авальбаев А.М., 17
Агеева И.В., 19
Агеева М.Н. 230
Азизбекян С.Г., 159
Аксенова М.А., 20
Аксючиц А.В., 251
Алексеева М.И., 27
Аллагулова Ч.Р., 17
Алхаже К., 30
Арзамазкина К.И., 73, 201, 203
Ахамуэфуле К.Ч, 181
Бабушкина К.О., 32, 46
Баранова Е.Н., 34
Бахметова А.Ф., 40, 307
Белозор А.С., 244
Бережнева З.А., 42
Билова Т.Е., 8, 9, 30, 96
Блинова А.А., 135
Бойко Е.В., 76
Бондаренко В.Ю., 154, 239
Бондаренко О.Н., 135
Борисова Г.Г., 181
Брейгина М.А., 32, 46,
Брилкина А.А., 230
Бурханова Г.Ф., 56, 301
Буцанец П.А., 121
Валитова Ю.Н., 49, 63
Вачинская А.В., 51
Веселова С.В., 56
Вечерек М.С., 62, 216
Викторова Л.В., 49
Власова Т.А., 19
Воденеев В.А., 164, 230
Воронков А.С., 252
Габриелян Л.С., 62, 216
Газизова Н.И., 176
Галеева Е.И., 49, 63, 97
Галибина Н.А., 66, 221
Гвоздь В.Д., 289
Генерозова И.П., 70, 71, 121
Герасимов Н.Ю., 70, 71
Герасимович К.М., 224
Герман А.Д., 73, 201, 203
Гилевская К.С., 109, 224
Головацкая И.Ф., 76
Головко Т.К., 80, 268
Голощанов А.Н., 70, 71
Голушко Н.И., 30
Горбач Д.П., 175, 176
Гордых С.А., 73
Горшков А.П., 294
Горшков О.В., 66
Горшкова Т.А., 66
Григориади А.С., 85
Гриусевич П.В., 91, 151, 203
Губаревич К.И., 73, 203
Гурина А.К., 96
Гурьянов О.П., 49, 63, 97
Гюльмисарян Е.В., 266
Даминова А.Г., 97, 176
Дарказанли М., 181
Демидчик В.В., 27, 62, 91, 103,
151, 154, 203, 216, 239, 244, 246,
249, 251, 276, 307, 316
Демченко К.Н., 104, 148
Дитченко Т.И., 105
Дымова О.В., 80
Еловская Н.А., 109
Емельянов В.В., 115

Ермошин А.А., 195
Ерофеева Н.О., 30
Ефремова Д.А., 119
Жабинский В.Н., 307
Жигачева И.В., 70, 71, 121
Жук Е.А., 127
Загоскина Н.В., 20, 129, 131
Заикина Е.А., 301
Занько Д.И., 315
Захожий И.Г., 80
Здобнова Т.А., 230
Змитрович И.В., 251
Зубова М.Ю., 129, 131
Зуенок С.С., 249
Иванова К.А., 291
Иванова Т.В., 252
Иваченко Л.Е., 135
Игнатенко А.А., 284
Ильина Е.Л., 148
Кадырбаев М.К., 76
Казантаева М., 140, 227
Казнина Н.М., 284
Калацкая Ж.Н., 109, 224, 301
Калганова Н.В., 96
Калейник М.Д., 216
Камионская А.М., 96
Карманов А.А., 105
Кем К.Р., 142
Кирюшкин А.С., 104, 148
Киселева И.С., 189
Климова А.В., 221
Кожевникова А.Д., 252, 259
Козел А.В., 201
Козел Н.В., 62, 216
Корженевский М.А., 66, 221
Коржова М.А., 221
Коротаева Н.Е., 149
Коряков И.С., 17
Котов Д.А., 251
Кошель С.А., 151
Кошиц Т.О., 154, 239
Красовский М.А., 249

Крикунова Н.И., 71, 121
Кузнецова Д.В., 164
Кузнецова М.В., 156
Кукулянская Т.А., 231
Куликовская В.И., 109
Кулуев Б.Р., 42
Курнушко А.С., 159
Кусакин П.Г., 291
Лаврентьева С.И., 135
Ладейнова М.М., 164
Ламан Н.А., 142
Лаптев Н.И., 76
Лексин И.Ю., 97, 119, 166, 176
Леонова Т.С., 96
Логвина А.О., 171
Логунов К.Т., 251
Лосев Е.Л., 105
Лось Д.А., 140, 266
Лотоцкий С.О., 195
Лукашева Е.М., 175, 176
Лунёва О.Г., 32, 46
Мазина А.Б., 176
Макарова Т.Н., 221
Максимов И.В., 56
Малева М.Г., 181
Малыгин М.В., 189
Мальшев Р.В., 268, 277
Маноян Д.Г., 62, 216
Маргарит А.А., 96
Марданшин И.С., 301
Матыков Н.Е., 195
Мацкевич В.С., 27, 62, 73, 151,
201, 203, 249, 251, 282, 288
Медведев С.С., 205
Мешалкина Д.А., 140
Микша Е.Ч., 249
Микша К.Ч., 288
Миль Е.М., 121
Минибаева Ф.В., 7, 49, 63, 97,
119, 166, 176, 208, 242
Можаровская Л.В., 40, 213
Молдавская С.Э., 149

Молчан О.В., 159
 Морозова А.А., 85
 Мощенская Ю.Л., 66, 221
 Мудрилов М.А., 164
 Муравицкая А.О., 62, 201, 203, 216, 288
 Муртазина Н.Д., 309
 Мусин Х.Г., 42
 Мухина А.А., 171
 Мучинская П.О., 282
 Мыслейко М.А., 62
 Неврова О.В., 70, 71
 Нестерович М.А., 218
 Нечаева Т.Л., 20, 131
 Никерова К.М., 66, 221
 Николайчук В.В., 224
 Нилова И.А., 284
 Новосельский И.Ю., 91
 Нужная Т.В., 56
 Овчинников И.А., 224
 Олескина Ю.П., 309
 Орлова А.А., 8, 96, 140, 227
 Осипов В.И., 131
 Палтарак А.С., 276
 Печёрина А.А., 164, 230
 Плотников А.А., 17
 Подобед П.И., 218
 Показаньева М.В., 189
 Приступа К.В., 231
 Прохорчик П.О., 154, 239
 Пустовая А.Д., 301
 Пшибытко Н.Л., 51, 241, 251, 316
 Пятрикас Д.В., 149
 Рассабина А.Е., 242
 Рахматуллина Д.Ф., 49, 63
 Румянцев С.Д., 56
 Русакович А.А., 51, 218, 244, 251
 Рыбинская Е.И., 109, 224
 Савицкий А.С., 62, 246
 Савич А.С., 239
 Самович Т.В., 62, 216
 Самохина В.В., 203, 249, 251, 282, 288
 Светлаков В.И., 216
 Семенова Л.И., 221
 Серегин И.В., 252, 259
 Серкова А.А., 66, 221
 Сидоров Р.А., 266
 Силина Е.В., 80, 268, 277
 Силинская С.А., 8, 96, 227
 Синетова М.А., 140, 266
 Слукин А.П., 227
 Соболева А.В., 9, 30, 96, 175, 227
 Соколик А.И., 62, 216, 249, 276
 Соловьева М.А., 175
 Сорокань А.В., 301
 Сотникова Ю.М., 85
 Софронова И.Н., 221
 Стариков А.Ю., 266
 Стромская Т.С., 307
 Табаленкова Г.Н., 268, 277
 Тарелкина Т.В., 66, 221
 Тарима В.В., 282
 Таскина К.Б., 284
 Толкач А.А., 288
 Толкачева Ю.В., 91
 Трифонова Т.В., 49, 97
 Тугбаева А.С., 189
 Уваева В.Л., 49
 Успенская М.С., 32
 Фархутдинов Р.Г., 85, 156
 Фаткуллин И.Я., 301
 Федяев В.В., 85
 Филиппова Г.Г., 127, 289
 Фролов А.А., 8, 9, 30, 96, 140, 175, 176, 227
 Хабибрахманова В.Р., 49, 63, 97, 242
 Хайруллина А.Ф., 49, 63, 242
 Храмцова Е.А., 231
 Хрипач В.А., 307
 Цветков В.О., 301
 Цветкова Е.В., 227
 Цыганов В.Е., 291, 294
 Цыганова А.В., 291, 294
 Черевацкая М.А., 96
 Черепанов И.А., 96

Черепанова Е.А., 301
Черныш М.А., 27, 218, 307
Чирва О.В., 66
Чирская А.И., 201
Шелякин М.А., 80, 166, 268
Шмаков В.Н., 149
Шумилина Ю.С., 96, 176

Юлдашев Р.А., 17
Юрина Н.П., 309
Яковец О.Г., 315
Якупова А.И., 17
Янушкевич М.А., 189
Яруллина Л.Г., 301
Яцзин Ш., 316

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
INTRODUCTION	4
<i>Beckett R. P.</i> Avoidance of ROS formation during fluctuating light stress in the photobionts of lichenized ascomycetes	5
<i>Frolova N.</i> Analysis of the primary metabolome in the study of redox processes in plants	6
<i>Frolova N.</i> Why proteomics is not a silver bullet in glycation research: peptide-based glycation models as a tool to address the mechanisms behind glycation in plants	7
<i>Абилова Г.А.</i> Протекторные эффекты салицилата натрия при адаптации растений пшеницы к действию кадмия	9
<i>Авальбаев А.М.</i> Влияние 24-эпибрасинолида на состояние про-/антиоксидантной системы у различающихся по стратегии адаптации к засухе экотипов пшеницы в условиях дефицита влаги.....	15
<i>Агеева И.В.</i> Исследование влияния хитозана на метаболизм зелёной водоросли в целях разработки экологически чистого метода борьбы с излишним разрастанием водорослей в водоёмах	17
<i>Аксенова М.А.</i> Антиоксидантный потенциал культур <i>Camellia sinensis</i> L. в условиях действия фенольных предшественников.....	18
<i>Алексеева М.И.</i> Анализ воздействия антигололедных реагентов на ростовые процессы высших растений и синтез АФК в клетках корня.....	25
<i>Алхаже К.</i> Изучение кинетики образования ковалентных аддуктов при взаимодействии вторичных метаболитов растений с белками пищи и организма человека в пептидной модельной системе.....	28
<i>Бабушкина К.О.</i> Продукция АФК на генеративных органах покрытосеменных растений при поранении	30
<i>Баранова Е.Н.</i> Супероксиддисмутаза премодулирует окислительный стресс в пластидах для защиты растений табака от повреждения	32
<i>Бахметова А.Ф.</i> Разработка праймеров для молекулярно-генетического анализа ДНК-маркеров <i>DHN1</i> и <i>DHN2 Beta vulgaris</i> L.....	38
<i>Бережнева З.А.</i> Изменения в антиоксидантной системе корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы <i>PtrXTH1</i> в условиях кадмиевого стресса	40
<i>Брейгина М.А.</i> Баланс активных форм кислорода на влажных рыльцах однодольных и двудольных растений	44
<i>Валитова Ю.Н.</i> Участие ферментативной и неферментативной антиоксидантных систем в стрессовом ответе лишайника <i>Peltigera canina</i> на действие повышенной температуры.....	47

<i>Вачинская А.В.</i> Характеристика фотосинтетических реакций проростков <i>Hordeum vulgare</i> при совместном воздействии <i>Fusarium culmorum</i> и повышенной температуры.....	49
<i>Веселова С.В.</i> Двойная роль каталазы в патосистеме <i>Triticum aestivum</i> - <i>Stagonospora nodorum</i> : фактор вирулентности или защиты.....	54
<i>Вечерек М.С.</i> Воздействие гипоксии в комбинации с депривацией N, S и Cu на рост и продукцию биоводорода клетками <i>Parachlorella kessleri</i>	60
<i>Галеева Е.И.</i> Тепловой стресс у лишайников рода Пельтигера: роль фотосинтетических пигментов.....	61
<i>Галибина Н.А.</i> Механизмы регуляции разных сценариев ксилогенеза на примере карельской березы: взаимодействие ауксинового и АФК-сигналинга.....	64
<i>Герасимов Н.Ю.</i> Как засуха и сероводород меняют структуру мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха	68
<i>Герасимов Н.Ю.</i> Влияние донора оксида азота (II) на структуру мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха	69
<i>Герман А.Д.</i> Эффект никеля и никель-гистидиновых комплексов на ростовые процессы у высших растений.....	71
<i>Головацкая И.Ф.</i> Мелатонин регулирует окислительный и антиоксидантный статус клеточных культур растений <i>in vitro</i>	74
<i>Головко Т.К.</i> Кооперативное взаимодействие компонентов антиоксидантной системы и механизмы контроля генерации активных форм кислорода в жизненном цикле зимующих листьев травянистых растений (на примере <i>Ajuga reptans</i> L.)	78
<i>Григориади А.С.</i> Ответ антиоксидантной системы растений подсолнечника на применение комбинаций биопрепаратов при их росте на нефтезагрязненной земле	83
<i>Гриусевич П.В.</i> Редокс-регулируемые K ⁺ -каналы GORK и анионные каналы ALMT1 вовлечены в отток электролитов из клеток корня <i>Arabidopsis thaliana</i>	89
<i>Гурина А.К.</i> Сиднонимины как модуляторы ответа растений на действие засухи.....	94
<i>Даминова А.Г.</i> Роль антрахинона париедина в устойчивости к обезвоживанию талломов лишайника <i>Xanthoria parietina</i>	95
<i>Демидчик В.В.</i> Сигнальный хаб на основе цитоплазматического Ca ²⁺ и активных форм кислорода в клетках высших растений	101
<i>Демченко К.Н.</i> Роль активных форм кислорода в инициации и развитии бокового корня	102
<i>Дитченко Т.И.</i> Антирадикальная активность экстрактов из культур клеток и тканей эхинацеи пурпурной	103
<i>Еловская Н.А.</i> Влияние нанокмполитов хитозан-серебро на компоненты антиоксидантной системы микроклональных растений картофеля в культуре <i>in vitro</i>	107

<i>Емельянов В.В.</i> Системно-биологический подход к изучению адаптации растений к дефициту кислорода и последующему окислительному стрессу	113
<i>Ефремова Д.А.</i> Дифференциальная экспрессия генов стрессового ответа в лишайнике <i>Xanthoria parietina</i> при дегидратации и регидратации	117
<i>Жигачева И.В.</i> Антиоксиданты повышают устойчивость растений к стрессовым воздействиям.....	119
<i>Жук Е.А.</i> Влияние прайминга семян на скорость окислительных процессов и активность пероксидазы в проростках пшеницы в условиях засоления	125
<i>Загоскина Н.В.</i> Фенольные антиоксиданты и их роль в адаптации растений к стрессовым воздействиям.....	127
<i>Зубова М.Ю.</i> Редокс-активные соединения флавановой природы с различной степенью полимеризации в <i>in vitro</i> культуре <i>Camellia sinensis</i> L. и их роль в стресс-устойчивости	129
<i>Иваченко Л.Е.</i> Влияние погодных условий сбора урожая сои на антиоксидантную систему её семян	133
<i>Казантаева М.</i> Исследование антиоксидантной активности и потенциала экстрактов цианобактерий в отношении противоопухолевого и нейропротекторного действия	138
<i>Кем К.Р.</i> О вероятности антистрессового действия брассиностероидов посредством изменения состояний плазматических мембран клеток растений.....	140
<i>Кирюшкин А.С.</i> Hairy CRISPR: изучение функциональных особенностей корневых систем растений с помощью метода геномного редактирования CRISPR/Cas	146
<i>Коротаева Н.Е.</i> Влияние водного дефицита на содержание дегидринов в клетках каллусной культуры сосны обыкновенной.....	147
<i>Кошель С.А.</i> Модификация ионных токов через плазматическую мембрану клеток корня <i>Arabidopsis thaliana</i> L. при воздействии Ni^{2+}	149
<i>Кошниц Т.О.</i> Анализ морфологических симптомов поражения декоративных растений фитопатогенами с использованием подходов цифрового фенотипирования.....	152
<i>Кузнецова М.В.</i> Ответ антиоксидантной системы растений на обработку растений эндофитными бактериями <i>Bacillus subtilis</i> при их росте в условиях абиотического стресса	154
<i>Курнушко А.С.</i> Влияние наночастиц селена и селенита натрия на активность глутатионпероксидазы в проростках редиса	157
<i>Ладейнова М.М.</i> Анализ участия пероксида водорода в системном изменении содержания фитогормонов при распространении переменного потенциала.....	162
<i>Лексин И.Ю.</i> Анализ профилей экспрессии генов микобионта и фотобионта лишайника <i>Lobaria pulmonaria</i> в ответ на УФ-индуцированную меланизацию.....	164

Логвина А.О. Влияние внесения источника селена в состав питательной среды на антиоксидантные свойства каллусной культуры и культуры микропобегов розмарина лекарственного (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	169
Лукашева Е.М. Использование bottom-up протеомного подхода в изучении гликированных белков хлоропластов.....	173
Мазина А.Б. NO-опосредованная аутофагия в высших растениях: от идентификации аутофагических генов до посттрансляционной модификации белков	174
Малева М.Г. Влияние цинк-солюбилизующих PGP-ризобактерий и опрыскивания йодом на редокс-реакции в листьях гороха (<i>Pisum sativum</i> L. сорт Мадрас).....	179
Малыгин М.В. Редокс-статус и формирование аэренхимы в корне ячменя при гипоксии	187
Матыков Н.Е. Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов <i>Salvia coccinea</i> Buc'hoz ex Etl. в разных фенологических состояниях	193
Мацкевич В.С. Воздействие свободных аминокислот на генерацию активных форм кислорода в условиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	199
Мацкевич В.С. Роль гистидина в индукции токсических и сигнальных реакций в корнях высших растений в ответ на Ni^{2+}	201
Медведев С.С. Как растение приспосабливается к гравитационным воздействиям: адаптация и стресс.....	202
Минибаева Ф.В. Метаболические “рыцари” древних лишайников: анти- и прооксиданты.....	205
Можаровская Л.В. Анализ структурно-функциональных особенностей и экспрессионной активности PR-9 генов проростков <i>Pinus sylvestris</i> в условиях инфицирования <i>Fusarium sp.</i>	211
Муравицкая А.О. Оценка влияния депривации элементов минерального питания на продукцию биоводорода и особенности фенотипа микроводорослей семейства <i>Chlorellaceae</i>	214
Нестерович М.А. Оценка эффективности антиоксидантов природного происхождения при солевом стрессе в растениях пшеницы мягкой	215
Никерова К.М. Система UPBEAT1-АФК-ПОД-PAL (UPBEAT1-ROS-POD-PAL) при изменении соотношения дифференцировка/пролиферация камбиальных инициалей у древесных растений на примере березы повислой <i>Betula pendula</i> var. <i>pendula</i> и карельской березы <i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i> (Mercl.) Hämet-Ahti	218
Овчинников И.А. Влияние конъюгатов хитозана и оксикоричных кислот на активность антиоксидантных ферментов в проростках ячменя в оптимальных условиях развития и при кратковременном воздействии натрий-хлоридного засоления.....	221
Орлова А.А. Антиоксидантный потенциал растений как ключ к успешной фармакотерапии.....	225

Печёрина А.А. Изучение волн активных форм кислорода с помощью генетически кодируемых сенсоров.....	227
Пристуна К.В. Характеристика показателей антиоксидантной системы трансгенных растений <i>Nicotiana tabacum</i> , выращенных в условиях загрязнения почвы ионами никеля (II)	228
Прохорчик П.О. Анализ физиологических характеристик растений <i>Pisum sativum</i> с использованием техники цифрового фенотипирования.....	236
Пишибытко Н.Л. Редокс-состояние подвижных переносчиков электронов хлоропластов определяет ответную реакцию фотосинтетического аппарата <i>Hordeum vulgare</i> при тепловом стрессе.....	238
Рассабина А.Е. Особенности пигментного состава лишайников <i>Lobaria pulmonaria</i> (L.) Hoffm. и <i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th.Fr.....	239
Русакович А.А. Оценка эндогенного антиоксидантного потенциала продуктов пищевой биотехнологии при помощи спектроскопии электронного парамагнитного резонанса.....	241
Савицкий А.С. Использование компьютерного зрения и сверточных нейронных сетей для фенотипического анализа ростовых процессов <i>Arabidopsis thaliana</i>	242
Самохина В.В. Строение, регуляция и функции катионных каналов, ответственных за выход K^+ из клеток высших растений в условиях стресса	246
Самохина В.В. Холодная плазмы атмосферного разряда индуцирует генерацию АФК и модифицирует ростовые процессы у высших растений.....	247
Серегин И.В. Влияние никеля и цинка на состав жирных кислот липидов мембран у исключателя <i>Arabidopsis lyrata</i> и гипераккумулятора <i>Arabidopsis halleri</i>	248
Серегин И.В. Роль низкомолекулярных лигандов в транспорте и детоксикации металлов у растений.....	255
Сидоров Р.А. Идентификация конъюгированных диенов жирных кислот у микроводоросли <i>Vischeria</i> sp. IPPAS C-70 в условиях окислительного стресса	263
Силина Е.В. Эффекты пониженной температуры на про-/антиоксидантный метаболизм и активность фотосинтетического аппарата листьев <i>Zea mays</i>	265
Смоликова Г.Н. Активные формы кислорода в биологии семян: от регуляторных функций к окислительному стрессу	269
Соколик А.И. Потеря калия корнями пшеницы при окислительном стрессе	273
Табаленкова Г.Н. Активность про/антиоксидантной системы в почках возобновления очитника трехлистного в процессе перезимовки.....	274
Тарима В.В. Воздействие CuO -НЧ и Fe_3O_2 -НЧ на рост корней <i>Arabidopsis thaliana</i>	279
Таскина К.Б. Влияние засоления на интенсивность окислительных процессов и активность компонентов антиоксидантной системы в листьях пшеницы	281

Толкач А.А. Влияние УФ-С на рост и накопление АФК в клетках корня <i>Arabidopsis thaliana</i>	285
Филиппова Г.Г. Модификация активности антиоксидантных ферментов и скорости окислительных процессов в растениях под действием пептидного элиситора AtPerp1	286
Цыганов В.Е. Глутатион в антиоксидантной системе защиты в клубеньках бобовых растений	288
Цыганова А.В. Роль пероксида водорода (H ₂ O ₂) в симбиотических клубеньках Бобовых	291
Черепанова Е.А. Влияние нанокompозитов хитозана и бактерий <i>Bacillus subtilis</i> на про/- антиоксидантную систему и устойчивость растений картофеля к инфицированию <i>Phytophthora infestans</i> и недостатку почвенной влаги	298
Черныш М.А. Особенности модификации ростовых процессов протокормов <i>Phalaenopsis</i> в культуре <i>in vitro</i> под действием экзогенных брассиностероидов	304
Юрина Н.П. Белки теплового шока как ранние маркеры окислительного стресса у растений	306
Яковец О.Г. Активность пероксидазы в растениях семейства <i>Cucurbitaceae</i> при гипотермии	312
Яцзин Ш. Функционирование устьичного аппарата <i>Pisum arvense</i> при обработке растений наночастицами оксида меди	313
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	315

Современные решения для лабораторий

ООО «ТоталЛаб», Минск, Беларусь. *E-mail: i.shestak@totallab.by

ООО «ТоталЛаб» предлагает широкий спектр аналитического и вспомогательного лабораторного оборудования. С нами работают более 300 ведущих предприятий Республики Беларусь.

Нам доверяют и с нами сотрудничают: фармацевтические; нефтегазовые; химические компании; аккредитованные лаборатории; учреждения образования и научно-исследовательские институты. аналитическое оборудование.

NovAA 800 F/G/Duo

Наиболее простыми и экономичными, а также идеально подходящими для рутинного анализа являются приборы серии novAA (рис. 1). У производителя представлены приборы с пламенным, электротермическим и гидридным способом атомизации вещества. Приборы отличаются одновременно компактными размерами и высокой производительностью.



Рис. 1. Атомно-абсорбционные спектрометры NovAA 800 F/G/Duo

Атомно-абсорбционные спектрометры позволяют определить около 70 элементов. В основном это металлы: Al, Ba, Be, V, Bi, W, Fe, Ca, Cd, Co, Si, Mg, Mn, Cu, Mo, Ni, Sn, Pb, Ti, Cr и Zn, но возможно определение некоторых неметаллов: As, B, I, P, Se, Si и Te. В настоящее время с использованием данного оборудования можно анализировать такие экологические объекты как природные и сточные воды, почвы, биологические ткани и жидкости, атмосферные выбросы, пищевые продукты и многие другие объекты.

Приборы серии novAA® характеризуются следующими особенностями:

- 8-ламповая турель с функцией предпрогрева.
- Одно- и двухлучевая оптическая схема в одной системе.
- Высокочастотная дейтериевая коррекция.
- Современное высокопроизводительное программное обеспечение.
- Графитовая печь с поперечным нагревом для минимизации эффектов памяти и улучшения качества проведения анализа.
- Интегрированная видеокамера для наблюдения и контроля за процессами внутри печи в ходе дозирования и атомизации.
- Прямой анализ твердых проб без предварительного растворения пробы.
- Дозирование проб в пламя в автоматическом режиме с функцией интеллектуального разбавления — для обеспечения максимального удобства и высокой производительности.

ZEEnit 650 P/700 P

Комбинация электротермического атомизатора с поперечным нагревом и зеемановского корректора неселективного поглощения позволяет обеспечить максимальную правильность результатов при определении малых содержаний элементов в сложных матрицах (рис. 2).



Рис. 2. Атомно-абсорбционный спектрометр ZEEnit 650 P/700 P

ZEEnit 650 P - атомно-абсорбционный спектрометр с электротермическим атомизатором и гидридной приставкой (опционально).

ZEEnit 700 P - компактный тандемный спектрометр с пламенным, электротермическим атомизатором и гидридной техникой (опционально).

В обоих приборах предусмотрено два вида коррекции неселективного поглощения - дейтериевый и Зеемановский.

Конструкция приборов позволяет анализировать как жидкие, так и твердые пробы без предварительной минерализации.

Аксессуары для атомно-абсорбционных спектрометров ZEE nit:

- Автодозаторы для работы с пламенным атомизатором ААС.
- Автодозаторы для работы с электротермическим атомизатором ААС.
- Дозирование твердых проб.
- Ртуть/гидридные системы.

Особенности:

- Коррекция фона по методу Зеемана в изменяемом магнитном поле позволяет подобрать оптимальную величину напряженности магнитного поля для каждого конкретного образца, а работа в 3-полевом режиме расширяет линейный диапазон градуировочного графика на несколько порядков.

- Атомизаторы расположены на одной оптической оси, что позволяет переключаться между разными режимами атомизации без каких-либо дополнительных манипуляций.

Оптические УФ-Вид спектрофотометры SPECORD plus 50/200/210/250

SPECORD plus 50 - псевдодвухлучевой спектрофотометр, оптимальный для проведения рутинных качественных и количественных измерений (рис. 3).



Рис. 3. Спектрофотометр SPECORD plus 50/200/210/250

Световой луч источника делится светоделителем в отношении примерно 4:1. Более интенсивный пучок пропускается через кювету с образцом, а более слабый направляется на светочувствительный элемент. Благодаря этому удастся сочетать высокую чувствительность прибора с высокой стабильностью измерений.

SPECORD plus 200 - истинно двухлучевой спектрометр с фиксированной шириной щели, симметричным расщеплением светового потока для максимальной точности анализа.

SPECORD plus 210 - двухлучевой прибор с изменяемой шириной щели монохроматора для анализов, требующих высокого спектрального разрешения.

SPECORD plus 250 - двухлучевой спектрометр с изменяемой шириной щели и двойным монохроматором для анализа образцов с большими коэффициентами светопоглощения и светорассеивающих образцов, таких как коллоидные растворы.

BWB XR - 5-канальный пламенный фотометр (рис. 4а), осуществляющий одновременное измерение Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} с отображением результатов в реальном времени.

BWB Flash - 1/2/3/4-канальный конфигурируемый фотометр (рис. 4б), способный определять от 1 до 4 элементов одновременно.



а

б

Рис. 4. Пламенные фотометры BWB:

а – BWB XR - 5-канальный пламенный фотометр; б – BWB Flash - 1/2/3/4-канальный пламенный фотометр

Преимущества:

- Индивидуальные детекторы для каждого из элементов (Na, K, Li, Ca, Ba), сенсор для пламени (ИК).
- Одновременное определение и вывод результатов по всем пяти элементам.
- Калибровка по двум и более точкам.
- Пересчет концентраций: ppm, мг/л, мэкв/л, ммоль/л.
- Детектор отключения пламени и автоматическое выключение.
- Индикаторы диагностики.

- Детектор заполнения сливной ловушки.
- Встроенный воздушный компрессор.
- Электронный контроль потока воздуха для оптимального качества результатов.

Преимущества:

- Встроенный воздушный компрессор.
- Выбор пользователем десятичных разрядов.
- Доступная сертификация IQ, OQ, PQ.
- Стандартные калибровочные эталоны с концентрацией 10 000 ppm, поставляемые в комплекте.
- Многоязычное программное обеспечение.
- Полный набор базовых лабораторных принадлежностей, необходимых для работы с прибором.

Оборудование компании Thermo Fisher Scientific, специализируется на разработке и производстве решений для анализа химических соединений.

Vanquish – новейшая биосовместимая ультравысокоэффективная жидкостная хроматографическая система (рис. 5a).

Газовые хроматографы серии TRACE 1600/1610 предназначены для оптимизации ежедневных операций и удовлетворения аналитических потребностей (рис. 5б).

Основные технические характеристики спектрометров iCAP PRO (рис. 5в):

- Одновременное измерение линий определяемых элементов в диапазоне от 167 до 852 нм.
- ВЧ генератор с мощностью, подводимой к плазме, от 750 Вт до 1400 Вт, частота генератора – 27 МГц.
- Двойной (аксиальный и радиальный) обзор плазмы.
- Оптическая схема Эшелле с продувкой полихроматора.
- CID детектор обеспечивает низкие пределы обнаружения.
- Полностью разборная горелка, циклонная распылительная камера для повышения стабильности плазмы, концентрический распылитель включены в стандартный комплект поставки и позволяют работать с большим количеством образцов.
- Возможность использования дополнительных распылительных камер для различных задач в т.ч для работы с органическими растворами или растворами, содержащими агрессивные минеральные кислоты.
- 12-роликовый перистальтический насос обеспечивает возможность автоматического добавления внутреннего стандарта или использования гидридной приставки.

- Приставки для расширения возможностей проведения анализа:
- Приставка генерации ртути и летучих гидридов. Позволяет работать с определением Hg, As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te на профессиональном уровне, обеспечивает максимальную чувствительность определения.
- Автосамплеры – полная автоматизация процесса калибровки и анализа.
- Приставки лазерного пробоотбора - анализ твёрдых образцов без растворения.
- Возможность анализа органических растворов с различными температурами кипения.



Рис. 5. *а* – Vanquish новейшая биосовместимая ультравысокоэффективная жидкостная хроматографическая система; *б* – Газовые хроматографы серии TRACE 1600/1610; *в* – Атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно связанной плазмой iCAP PRO

1260 Infinity II/ Infinity 1290

ВЭЖХ 1260 Infinity II — это классическая система ВЭЖХ с возможностью выбора модулей под широкий спектр аналитических задач от стандартного анализа примесей и разработки и переноса методов до новейших исследований в области определения молекулярно-массового распределения, сверхкритической флюидной хроматографии и двухмерной хроматографии с многократным переносом пиков (рис. 6).



Рис. 6. ВЭЖХ 1260 Infinity II/ Infinity 1290

Отличие Infinity 1290 – новый насосный блок повышенной мощности обеспечивает давление до 120 Мпа (1200 бар). Это позволяет применять любые типы сорбента и колонки любых размеров, а также использовать любые подвижные и неподвижные фазы.

Особенности ВЭЖХ 1260 Infinity II:

- Быстрое и точное смешивание компонентов подвижной фазы.
- Простая интеграция в лабораторную инфраструктуру.
- Многофункциональное программное обеспечение.
- Фронтальный доступ к ключевым узлам модулей.
- Стабильная работа ВЭЖХ и ЖХМС систем.
- Система самодиагностики и оповещения.
- Гибкая система переключения колонок.
- Система детектирования утечек.
- Максимальная эффективность.
- Высокая производительность.
- Огромный выбор модулей.

Хроматомасс-спектрометр Agilent Technologies 5977B GC/MSD

5977B GC/MSD является флагманской моделью в серии самых надежных одноквадрупольных GC/MS систем, предлагаемых компанией Agilent. Предназначен для проведения испытаний образцов в лабораториях, специализирующихся в областях экологического, химического, нефтехимического, пищевого, судебного и фармацевтического контроля (рис. 7).



Рис. 7. Хроматомасс-спектрометр Agilent Technologies 5977B GC/MSD

В схеме масс-спектрометра применяются разработанные на основе многолетнего опыта инноваций компании Agilent ионный источник высокой эффективности (HES) и экстрактор (EI Inert Plus Extractor), максимизирующие количество ионов, которые образуются и переносятся непосредственно из источника ионов в квадрупольный анализатор.

Особенности:

- Вакуумный турбомолекулярный насос с одним форвакуумным насосом.
- Диффузионный вакуумный насос с форвакуумным насосом Pfeiffer DUO 2.5.
- Три разных типа ионных источников для ионизации электронным ударом.
- Возможна модернизация на месте установки до химической ионизации (ПХИ/ОХИ), которая состоит из дооснащения источником химической ионизации (ХИ), контроллером потока газа-реагента и трубками, а также калибровки и настройки ХИ.
- Гиперболический квадрупольный фильтр, независимо нагреваемый МСД.
- Электронный детектор с высокоэнергетическим динодом (ВЭД).
- Интерфейс ГХ-МСД.
- Независимо нагреваемый газовый хроматограф.

ICP MS спектрометр iQuad – это классическая технология в современном исполнении – мощный радиочастотный генератор, высокоэффективная ионная оптика, гексаполь для удаления помех, возможность удаленного управления прибором с мобильного устройства (рис. 8).



Рис. 8. ICP MS спектрометр iQuad

Особенности ICP MS спектрометра iQuad:

- Цифровой полупроводниковый радиочастотный генератор (RF) мощностью 27 МГц.
- Возможность автоматического изменения мощности плазмы при анализе для обеспечения стабильного и воспроизводимого режима работы.
- Распылительная камера из кварца высокой чистоты с циклонным распылителем и Пельтье охлаждением.
- Двухрежимный дискретный диодный электронный умножитель Автосамплер: загрузка не менее 50 образцов.
- Удаленное управление прибором с помощью приложения на телефоне или планшете.
- Автоматическое переключение внутри образца между горячей и холодной плазмой.
- Концентрический распылитель из боросиликатного стекла со скоростью потока 200 мкл/мин.
- Гексаполь для устранения фона и аналитический квадруполь, обеспечивающий первичное разделение по массам, уменьшающий матричную нагрузку на систему устранения фона.

Продукция Компании SHINE широко используются в области защиты окружающей среды, контроля качества пищевых продуктов и лекарств, гидрогеологии, нефтехимии, здравоохранения и профилактики эпидемий, электроники, в сфере научных исследований и в прочих отраслях (рис. 9).



Рис. 9. а – Ионный хроматограф CIC-D160+; б – Ионный хроматограф CIC-D300+

CIC-D160+ — это высокостабильный ионный хроматограф с модернизированной схемой потоков, который позволяет обнаруживать анионы, катионы, цианиды, йодиды, сахара и низкомолекулярные органические кислоты (рис. 9а). Имеет встроенный генератор элюента.

Характеристики:

- Насос, максимальное давление: 42 МП.
- Объем ячейки: $\leq 0,8$ мкл.
- Предел обнаружения: $\leq 0,0020$ нс/см.
- Шаг концентрации: 0,1 мм.
- Диапазон скорости потока: 0,1-5,0 мл/мин.

CIC-D300+ — это модель интеллектуального двухканального ионного хроматографа нового поколения, которая самостоятельно разработана и произведена компанией SHINE (рис. 9б). Как в части программного, так и аппаратного обеспечения. Оба канала работают параллельно, независимо и без взаимных помех, обеспечивая одновременное обнаружение катионов и анионов.

Особенности:

- 10-дюймовый сенсорный HD-экран.

- Встроенный генератор элюента с двойной мембраной.
- Модуль сверхчистой онлайн-очистки: он может очищать воду онлайн и снижать потребность прибора в воде.
- Система аспирационного отбора проб.

Системы очистки воды

RephiLe Bioscience представляет широкий диапазон решений для лабораторной очистки воды с производительностью от 5л/ч до 600л/ч для самых разнообразных применений, таких как:

ВЭЖХ-МС, питание клинических анализаторов, автоклавов, климатических камер и прочее.

Система очистки воды NuZar U24 (рис. 10а) производит воду типа I и типа III (RO) из водопроводной воды. Качество воды I и III типа соответствует требованиям CLSI, CAP, ГОСТ ISO 3696.

Система имеет встроенный накопительный бак, либо может быть укомплектована отдельно стоящим баком произвольного объема.

Система очистки воды NuZar Q (рис. 10б) производит воду типа I из RO, EDI, дистиллированной или деионизированной воды. Качество воды I типа соответствует требованиям CLSI, CAP, ГОСТ ISO 3696.

Система очистки воды Rephile PURIST Ultrapure (рис. 10в) производит ультрачистую воду типа I с сопротивлением 18,2 Мом см, что соответствует требованиям ГОСТ ISO 3696-2013 к очищенной воде I-го типа.



Рис. 10. а – Система очистки воды NuZar U24; б – Система очистки воды NuZar Q; в – Система очистки воды Rephile PURIST Ultrapure

Характеристики:

Качество питающей воды: очищенная вода методом обратного осмоса, дистиллированная вода, деионизированная вода.

Особенности:

- Соответствие воды I типа ГОСТ ISO 3696-2013 подтверждено протоколом испытаний РУП "НПЦ гигиены" Минздрава РБ.

- Автоматическая рециркуляция системы каждый час для предотвращения роста бактерий внутри системы.

- Наличие двухволновой (185/254 нм) ультрафиолетовой лампы для уничтожения бактерий и снижения уровня органики.

- Объемное дозирование и калибровка.

- Информация о сигналах тревоги и обслуживании на цветном ЖК-мониторе.

- Возможность адаптации к различным конечным фильтрам (конечные фильтры для ВЭЖХ или для удаления РНКаз/эндотоксинов).

- Дозатор имеет встроенный высокоточный датчик удельного сопротивления с постоянной ячейки $0,01 \text{ см}^{-1}$ для измерения качества воды I-ого типа непосредственно перед дозированием.

- Компактные размеры.

- Эргономичный дизайн, обеспечивающий простую установку, эксплуатацию и обслуживание.

Упариватель в токе азота Preekem N1-50 (рис. 11а) используется для концентрирования растворителей для комплексного анализа; выпаривания экстракционного растворителя для анализа ГХ, ГХ-МС и ВЖЭХ / МС; концентрирования растворителей для приготовления образцов лекарственных средств или экстрактов пестицидов; являются альтернативой роторным испарителям, главным образом, при работе с большим количеством образцов малых объемов (50 мл и 15 мл).

Система очистки кислот Preekem S1 (рис. 11б) предназначена для очистки азотной, соляной, плавиковой кислот, а также перекиси водорода.

Максимальная производительность установки до 2 л кислоты в сутки. Уровень очистки до 10 ppt, по загрязняющему компоненту.

Особенности системы:

- Отсутствие металлических деталей и, как следствие, исключение вторичного загрязнения.

- Выносная система управления с готовыми методиками перегонки для разных типов кислот

- Скорость перегонки 1,25 мл/мин

- До 2 л сверхчистой кислоты в сутки.

- Низкое энергопотребление и отсутствие расходных материалов.



а



б

Рис. 11. *а* – Упариватель в токе азота Preekem N1-50; *б* – Система очистки кислот Preekem S1;

Принцип работы установки основан на перегонке кислот при температурах ниже, чем температура кипения. Такой подход обеспечивает очистку вплоть до 10 ppt по загрязнителям. Сверхчистые кислоты могут использоваться в дальнейшем при проведении аналитических измерений с использованием методов атомно-абсорбционной спектрометрии, спектрофотометрии, инверсионной вольтамперометрии и спектрометрии с использованием индуктивно связанной плазмы.

Роторные испарители AUWII (рис. 12*а*) - устройства, предназначенные для отгонки и перегонки растворителей из круглодонных одnogорлых колб различной емкости. Отгонка растворителя осуществляется при вращении колбы и постоянном перемешивании. Равномерное кипение достигается за счет того, что поток конденсата постоянно улавливается эффективным холодильником, который также является частью роторного испарителя.

Системы разложения с графитовым покрытием для кислотного разложения AUWII (минерализации) (рис. 12*б*) или упаривания в открытых сосудах неорганических и органических веществ при подготовке проб к анализу методами ИСП-МС, ИСП-АЭС и ААС. Для обработки образцов почвы, органических веществ почвы, разложения йода в моче. Высокая производительность разложения. Автоматическое поднятие и опускание образца. Антикоррозийное и прочное покрытие.



а

б

Рис. 12. а – Роторные испарители AUWII; б – Системы разложения с графитовым покрытием для кислотного разложения AUWII

Безопасные крышки SafetyWasteCaps AUWII для жидких отходов.

Безопасный сбор жидких отходов, для здоровья и защиты окружающей среды. SafetyWasteCaps блокируют пары вредных растворителей и обеспечивают безопасное выравнивание давления в контейнере для отходов. Высококачественный пластик гарантирует оптимальную химическую стойкость даже против агрессивных органических растворителей.



Рис. 13. Безопасные крышки SafetyWasteCaps AUWII для жидких отходов

Фильтр вытяжного воздуха защищает от паров растворителя.

- Активированный уголь имеет активную площадь фильтра 1200 м²/г, оптимизированную для паров растворителя.

- Префильтр для оптимального режима потока.

- Постфильтр обеспечивает безопасное закрытие и чистоту фильтра,

- Трубки и капилляры плотно завинчиваются.

- Отсутствие перекручивания шлангов, простая замена контейнера благодаря свободно вращающейся крышке.

- Корпус изготовлен из медицинского ПТФЭ, безопасен для пищевых продуктов, соответствует требованиям FDA

- Крышка с резьбой из PPS, автоклавируемая / стерилизуемая до 200°C

- -PTFE и PPS с химической стойкостью и классом огнестойкости V-0 (UL-94)

- Улучшенные уплотнения для оптимальной герметичности

- Улучшенные фитинги PFA

- Улучшенная эргономика, более стабильная конструкция

Обратная связь от наших клиентов - удобный и надежный ресурс, который положительно влияет на нашу результативность. В общении с клиентом мы ценим доверие и комфорт, и стараемся перенести это ощущение уверенности на решения, которые клиенты получают от нас, выстраивая с клиентами долгосрочные доверительные отношения.

Самая главная ценность нашей компании — это команда профессионалов, которая позволяет успешно реализовывать самые сложные проекты. Коллаборация знаний и опыта, полученная в процессе реализации самых разных проектов позволяет успешно решать разной сложности задачи в короткие сроки.

Наш девиз: «Доверие заказчиков и уважение партнеров».

ООО «ТоталЛаб» - работаем на результат!

Научное издание

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ
РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ**

**Тезисы докладов
IV Международного симпозиума
и школы молодых ученых
«Роль активных форм кислорода и азота
в жизни растений»**

**Республика Беларусь
Минск, 25–28 августа 2024 г.**

На русском и английском языках

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *Н. Л. Пишбытко*
Компьютерная верстка *П. О. Прохорчик*
Дизайн обложки *М. А. Сарасек*

Подписано в печать 08.08.2024. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 19,99. Уч.-изд. л. 19,95.

Тираж 80 экз. Заказ

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Отпечатано с оригинал-макета заказчика