

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 супероксиддисмутаза 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. Супероксиддисмутаза (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.

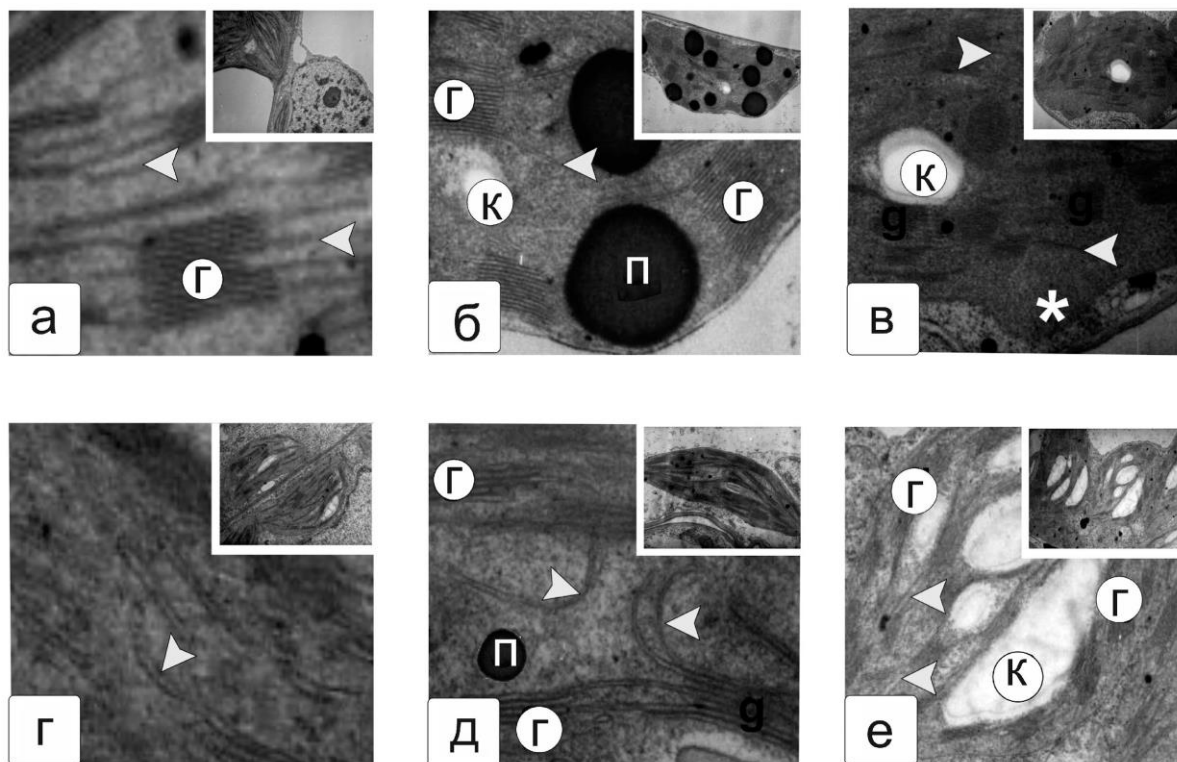


Рис 1. Фрагменты пластид ультраструктуры хлоропластов клеток мезофилла в листьях табака WT (а–в) и FeSOD-трансгенных (г–е) растений в норме (а,г), через 7 дней после низкотемпературного воздействия при + 8 °С (б, д) и через день после восстановления после снятия стресса (в, е). Условные обозначения: 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 внутривулларных 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-