

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. Orchideen 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 HSP70В 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 HSP70В 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 °С, 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 HSP70В хлоропластов любезно предоставлены проф. M. Schroda, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg в разведении (1:5000). В качестве вторичных антител использовали козлиные 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 HSP70В 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 HSP70В 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 HSP70В 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 HSP70В не отмечено. В результате действия теплового стресса на растения тыквы *C. moschata* выявлено уменьшение уровней HSP70 и HSP70В по сравнению с необработанными растениями. Увеличение уровней HSP70 цитоплазмы и HSP70В 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 HSP70В 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 sHSP17.4С1 *Arabidopsis* в качестве маркера окислительного стресса [5]. Участие АФК в индукции HSP17.4С показано в опытах, в которых растения обрабатывали пероксидом водорода. Установлено, что такая обработка повышала уровень экспрессии генов HSP17.4С [5]. Это предполагает, что быстрая индукция и высокая экспрессия гена *HSP17.4С1* при различных стрессовых состояниях, сопряженная с образованием АФК, может играть важную роль в снижении окислительного стресса, а HSP17.4С1 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 секвенированных 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-

организмы, 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 большой 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., Mitrovskaya 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.^{A*}, Занько Д. И.^A

^A 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 последнее 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 P2, 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