

ISSN 0015-3303

Том 70, Номер 2

Март - Апрель 2023



# ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 70, номер 2, 2023

---

---

## ОБЗОРЫ

|   |     |
|---|-----|
| Участие оксида азота в регуляции развития растений и их устойчивости к дефициту влаги                     |     |
| <i>Ч. Р. Аллагулова, Р. А. Юлдашев, А. М. Авальбаев</i>   | 115 |
| Участие наночастиц металлов и их оксидов в регуляции про-/антиоксидантного баланса у высших растений      |     |
| <i>Ю. В. Венжик, А. Н. Дерябин</i>  | 133 |
| Возможные физиологические механизмы фотоповреждения листьев растений в условиях круглосуточного освещения |     |
| <i>Т. Г. Шibaева, А. В. Мамаев, А. Ф. Титов</i>   | 148 |
| Регенерация папоротников в культуре <i>in vitro</i> посредством зеленых глобулярных тел                   |     |
| <i>Л. А. Шелихан</i>  | 160 |

---

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|   |     |
|---|-----|
| Сравнительная характеристика генов 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназ <i>SLNCED1</i> и <i>SLNCED2</i> в процессе развития и созревания плода томата |     |
| <i>Г. И. Ефремов, А. А. Ашихмин, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева</i>   | 171 |
| Сравнительный анализ состава стеринов эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий <i>Larix sibirica</i> Ledeb                                     |     |
| <i>Н. В. Семёнова, В. Н. Шмаков, Ю. М. Константинов, Л. В. Дударева</i>   | 181 |
| Роль метилирования промоторов генов глутаматдегидрогеназы ( <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i> ) в регуляции их экспрессии в листьях кукурузы при гипоксии   |     |
| <i>А. Т. Епринцев, Г. Б. Анохина</i>  | 192 |
| Лабораторная система для интенсивного культивирования микроводорослей и цианобактерий   |     |
| <i>Д. А. Габриелян, М. А. Синетова, А. К. Габриелян, Л. А. Бобровникова, В. С. Бедбенов, А. Ю. Стариков, А. А. Зорина, Б. В. Габель, Д. А. Лось</i> | 202 |
| Биохимический состав клеток <i>Euglena gracilis</i> при миксотрофном росте в присутствии различных органических субстратов                          |     |
| <i>Е. И. Гулк, Е. Б. Замяткина, К. Биркемайер, Е. Р. Тараховская</i>  | 214 |

---

---



УДК 581.1

## УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ И ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К ДЕФИЦИТУ ВЛАГИ

© 2023 г. Ч. Р. Аллагулова<sup>а</sup>, \*, Р. А. Юлдашев<sup>а</sup>, А. М. Авальбаев<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

\*e-mail: allagulova-chulpan@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.07.2022 г.

После доработки 19.10.2022 г.

Принята к публикации 20.10.2022 г.

Оксид азота – универсальная сигнальная молекула, вовлекаемая в модуляцию метаболической активности в ходе нормального роста и развития растений, и при формировании их устойчивости к стрессовым факторам окружающей среды. В обзоре представлены ключевые сведения, отражающие современное состояние проблемы регуляторной роли NO в растениях. Приведены краткие сведения о физико-химических свойствах NO, методах его исследования, путях биосинтеза и функциональной активности на разных этапах развития растений (прорастание, вегетативный рост, цветение, корнеобразование, симбиоз, минеральное питание). Кроме того, описано проявление защитных эффектов NO в условиях дефицита влаги, поскольку нарушение водного режима и обезвоживание растений наблюдается при воздействии разных абиотических стрессовых факторов, включая засуху, засоление, гипо- и гипертермию. Особое внимание уделено молекулярным механизмам NO-зависимого сигналинга, которые реализуются в растениях на геномном, протеомном и пост-протеомном уровнях в ходе множественных реакций нитрования. Понимание механизмов регуляторного действия NO в норме и при стрессе имеет важное теоретическое и прикладное значение в связи с необходимостью фундаментального обоснования возможности практического применения NO с целью повышения устойчивости и продуктивности культурных растений.

**Ключевые слова:** абиотический стресс, дефицит влаги, засуха, оксид азота, нитрование, пост-трансляционные модификации, растительный онтогенез, регуляция метаболизма, устойчивость

**DOI:** 10.31857/S0015330322600437, **EDN:** GKKMZ

### ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) – газообразная молекула, выполняющая сигнальные функции у всех живых организмов, включая растения, участвующая в регуляции множественных физиолого-биохимических процессов. О способности растений к образованию NO стало известно еще в 1970-х г.г., когда была выявлена его эмиссия у бобовых культур при их обработке гербицидами [1]. Однако вплоть до начала 1990-х г.г. он рассматривался в качестве токсичного соединения, поскольку его значительные количества обнаруживались среди компонентов выхлопных газов и промышленных отходов. Смена представлений относительно токсичности NO произошла после установления его роли в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы человека. В связи с этим в 1992 г. NO был признан молекулой года [2], а в 1998 г. трое американских ученых фармаколога – Ф. Мюррад, Р. Фарчготт и Л. Игнаро – были удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины. С того времени проведено колоссальное

количество работ, посвященных исследованию функциональной активности NO в разных биологических объектах, благодаря чему было неопровержимо доказано, что он необходим для нормального протекания жизнедеятельности не только животных и человека, но и представителей всех царств живых организмов. В растениях он вовлекается в реализацию онтогенетических программ на всех этапах их роста и развития от прорастания до цветения и созревания, а также в формирование стрессоустойчивости.

Выполнение оксидом азота множественных функций связано с его физико-химическими свойствами. Он является нейтральной двухатомной молекулой, растворимой в воде и в липидах. Наличие неспаренного электрона в структуре NO обуславливает его высокую реакционную способность и короткое время жизни, исчисляемое секундами [3, 4]. Благодаря амфифильной природе и свободно-радикальным свойствам он способен легко проникать через липидную фазу мембран и диффундировать через цитоплазму, быстро вступая

в реакции со своими многочисленными молекулярными мишенями. NO и его активные производные объединяют в группу активных форм азота (АФА), к числу которых в частности относят: NO<sup>-</sup> – нитроксильный анион (анион нитрозония); NO<sup>+</sup> – нитрозильный катион (катион нитрозония); NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – нитрит анион; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – нитрат анион; ONOO<sup>-</sup> – пероксинитрит, который выступает в качестве одного из главных нитрирующих агентов, функционирующих в NO-зависимых процессах передачи сигнала [4, 5]. В качестве АФА также рассматриваются некоторые S-нитрозотиолы (SNO), например S-нитрозоглутатион (GSNO), образуемый путем взаимодействия NO с глутатионом, выполняющим важные функции в поддержании гомеостаза NO, его отдаленном транспорте и передаче NO сигнала. При этом NO-зависимые пути регуляции растительного метаболизма связаны с реакциями транс-нитрозилирования, приводящие к модуляции активности генетических программ и к различным пост-трансляционным модификациям (NO-PTM) белков, среди которых наиболее хорошо изученными являются процессы нитрования по тирозину и S-нитрозилирования [6]. Таким образом, обладая высокой реакционной способностью и свободно радикальными свойствами, NO обуславливает запуск колоссального множества цепных реакций, чем объясняется чрезвычайно широкий спектр его биологического действия [7–10]. Вместе с тем необходимо отметить, что в избыточных концентрациях NO способен оказывать цитотоксическое действие, вызывая в живых организмах нитрозативный стресс [11, 12].

Особый интерес к NO вызван его участием в развитии устойчивости растений к стрессовым факторам среды биотического и абиотического происхождения. Среди них наиболее широко распространенным и непредсказуемым фактором является засуха. Вызывая в растениях нарушение водного режима и обезвоживание тканей, засуха негативно отражается на всех звеньях растительного метаболизма, процессах роста и развития, и формирования урожая [13–16]. Обезвоживание растительных тканей наблюдается также при других неблагоприятных воздействиях абиотического происхождения, например при засолении, гипо- и гипертермии [17]. Поэтому одним из наиболее актуальных направлений современной науки о растениях является поиск эффективных и безопасных способов защиты растений от пагубного действия водного стресса. Данные о повышении стрессоустойчивости культурных растений под влиянием экзогенной обработки NO, а также о его способности стимулировать процессы роста в нормальных условиях произрастания (табл. 1), указывают на возможность его использования в практическом растениеводстве с целью повышения устойчивости и продуктивности культурных растений.

Вместе с тем практическое применение оксида азота предполагает глубокое понимание молекулярных механизмов его физиологического действия в норме и при стрессе [18, 19]. В данном обзоре проводится последовательное описание проявлений функциональной активности NO в ходе основных этапов растительного онтогенеза, включая прорастание, вегетативный рост, цветение, корнеобразование, минеральное питание и установление симбиотических связей. Кроме того, на физиологическом и биохимическом уровнях рассматриваются NO-индуцированные защитные реакции растений, подвергнутых водному стрессу. Особое внимание уделено молекулярным механизмам NO-зависимого сигналинга, которые реализуются в растениях в норме и при неблагоприятных воздействиях на геномном, протеомном и пост-протеомном уровнях.

## 1. ОБРАЗОВАНИЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ ГОМЕОСТАЗА NO В РАСТЕНИЯХ

Пути образования оксида азота в растительных организмах подробно рассматриваются в ряде отечественных и зарубежных обзоров [4, 18, 20, 21]. Коротко следует напомнить, что совокупность биохимических превращений, приводящих к продукции молекулы NO, протекает по двум альтернативным механизмам: (1) – окислительному и (2) – восстановительному [4, 22]. В первом случае биосинтез NO происходит при окислении различных субстратов, таких как L-аргинин, полиамины и гидроксилламин с образованием продуктов окисления и высвобождением молекулы NO [4]. На примере млекопитающих хорошо изучена реакция окисления L-аргинаина, протекающая в присутствии молекулярного кислорода при участии специфических ферментов NO-синтаз (NOS), конечными продуктами которой являются L-цитруллин и молекула NO [4]. Реакцию можно выразить в виде схематического уравнения:



Однако NOS-ферменты у высших растений пока не идентифицированы, о чем свидетельствуют данные крупномасштабного скрининга более чем 2000 секвенированных растительных геномов [23]. Среди фотосинтезирующих организмов NOS-подобные последовательности выявлены у 15 видов одноклеточных зеленых водорослей, включая *Ostreococcus tauri*, для которой также было продемонстрировано наличие функционально активного NOS фермента, обладающего высокой степенью гомологии с NO-синтазами млекопитающих [20, 22, 23]. Вместе с тем сведения об угнетении синтеза NO в растениях под влиянием ингибиторов NOS-активности животных, а также данные, в которых продукция NO оценивалась по образованию цитруллина, позволяют предполагать суще-

Таблица 1. Роль NO в регуляции ответных реакций растений

| Растительный объект  | NO обработка   | Стресс | Наблюдаемые эффекты  | Ссылка   |
|--|--|--------|--|----------|
| Латук посевной ( <i>L. sativa</i> )  | SNP (100 $\mu$ M)<br>SNAP (100 $\mu$ M)<br>проращивание семян в присутствии доноров NO   | —      | Стимуляция прорастания семян   | [44]     |
| Пшеница ( <i>T. aestivum</i> L.)   | SNP (200 $\mu$ M)<br>Присутствие в среде выращивания проростков  | —      | Стимуляция прорастания семян, усиление роста корней и побегов, активация клеточного деления, повышение митотического индекса апикальной меристемы корней, накопление гормонов цитокининовой природы  | [45]     |
| Нут ( <i>C. arietinum</i> )  | SNAP (500 $\mu$ M)<br>SNP (500 $\mu$ M)<br>Присутствие в среде прорастания. Оценка показателей через 24, 48, 72 ч                            | —      | Стимуляция прорастания семян, активация экспрессии генов, связанных с утилизацией сахаров ( <i>Hexokinase 1</i> ; <i>Phosphofruktokinase 6</i> ; <i>Alpha amylase</i> ) и генов клеточного цикла ( <i>cyclin-D4-1-like</i> ; <i>cyclin-B1-4-like</i> ) | [46]     |
| Пшеница ( <i>T. aestivum</i> ), ячмень ( <i>H. vulgare</i> ), соя ( <i>G. max</i> ), рис ( <i>O. sativa</i> ), кукуруза ( <i>Z. mays</i> ), рапс ( <i>B. napus</i> ), горчица ( <i>B. juncea</i> ) | SNP ( $0.5 \times 10^{-3}$ mol/L <sup>-1</sup> )<br>12-ч обработка семян   | —      | Стимуляция прорастания семян, повышение ферментативной активности $\beta$ -амилазы   | [47]     |
| Кукуруза ( <i>Z. mays</i> )  | NaNO <sub>2</sub> ( $10^{-7}$ M)<br>SNP ( $10^{-10}$ M)<br>S-нитрозотиолы (GSNO; нитроцистеин).<br>Присутствие в среде прорастания           | —      | Стимуляция роста корней, регуляция активности мембранных Ca <sup>2+</sup> -каналов   | [49]     |
| Томат ( <i>L. esculentum</i> ), огурец ( <i>C. sativus</i> )   | SNP (200 $\mu$ M)<br>3-дневные растения инкубировали в присутствии донора NO в течение 5 суток   | —      | Изменение архитектуры корней (активация роста боковых и придаточных корней на фоне замедления роста первичного корня), усиление экспрессионной активности генов циклинов <i>CYCD 3;1</i> и <i>CYCA 2;1</i>   | [52, 53] |
| Боб обыкновенный ( <i>V. fava</i> )  | SNP (10, 100 и 150 $\mu$ M)<br>АБК (10 $\mu$ M)<br>Инкубирование отрезков эпидермиса листьев в растворе SNP в присутствии или отсутствии АБК | —      | Стимуляция закрытия устьиц. АБК-индуцированное накопление NO в замыкающих устьица клетках  | [80]     |

Таблица 1. Продолжение

| Растительный объект   | NO обработка  | Стресс  | Наблюдаемые эффекты  | Ссылка |
|---|---|---|--|--------|
| Растения кукурузы ( <i>Z. mays</i> ) дикого типа. Мутантные линии: <i>yellow stripe 1 (ys1)</i> и <i>yellow stripe 3 (ys3)</i> с нарушением усвоения Fe | SNP (100 $\mu$ M)<br>SNAP (100 $\mu$ M)<br>1. Опрыскивание растений растворами доноров NO<br>2. Внесение доноров NO в питательный раствор | Умеренный дефицит Fe (50 $\mu$ M Fe-EDTA).<br>Сильный дефицит железа (10 $\mu$ M Fe-EDTA) | Поддержание уровня накопления биомассы, предотвращение хлороза листьев, повышение уровня хлорофилла, поддержание структурной целостности хлоропластов; активация экспрессии генов хлоропластных белков: <i>rbcL</i> (Rubisco large subunit) <i>psbA</i> (D1 protein). Восстановление нормального фенотипа у Fe-дефицитных мутантов | [56]   |
| Люпин белый ( <i>L. albus</i> )   | SNP (50 $\mu$ M)<br>1. Присутствие SNP в среде прорастания в течение 3-х недель<br>2. Инкубирование корней в течение 24 ч                 | Дефицит P (присутствие/отсутствие $\text{K}_2\text{HPO}_4$ в питательном растворе)        | NO-индуцированная стимуляция роста латеральных корней, формирование кластерной структуры корней, сопровождаемое повышением уровня экссудации цитратов и улучшением усвоения фосфора. Усиление продукции NO в корнях 3, 7, 14-дневных растений, необработанных NO и подвергнутых дефициту фосфора.                                  | [61]   |
| Фасоль обыкновенная ( <i>Ph. vulgaris</i> ), вигна ( <i>V. unguiculata</i> )  | SNP ( $10^{-4}$ M)<br>Ежедневное опрыскивание 4-дневных растений в течение 10 сут   | Дефицит влаги (ограничение полива)  | NO-индуцированное повышение устьичной проводимости, поддержание уровня ОСВ листьев и целостности мембранных структур   | [78]   |
| Виноград ( <i>V. vinifera</i> )   | —   | Дефицит влаги (ограничение полива)  | Продукция NO в замыкающих устьица клетках. Параллельное повышение концентрации NO и АБК в листьях. Выявление корреляции между накоплением АБК, NO и закрытием устьиц. Роль NO в предотвращении потери влаги растением в условиях засухи  | [79]   |
| Индийская горчица ( <i>B. juncea</i> )  | SNP (100 $\mu$ M)<br>Инкубирование 20-дневных растений в течение 4 сут в присутствии донора NO  | Дефицит влаги (10% PEG)   | Поддержание водного режима (ОСВ, транспирации, устьичной проводимости); фотосинтетической активности, уровня ассимиляции $\text{CO}_2$ , функционирования ЭТЦ в хлоропластах и ФСЦ, поддержание уровня хлорофилла, активности фотосинтетических ферментов (RuBisCo; глицeroальдегид-3-фосфатдегидрогеназы; фосфорибулокиназы)      | [82]   |

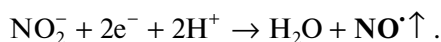
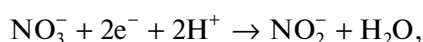
Таблица 1. Окончание

| Растительный объект                         | NO обработка  | Стресс   | Наблюдаемые эффекты  | Ссылка |
|---|---|--|--|--------|
| Физалис угловатый ( <i>Ph. angulata</i> )   | SNP (50, 75, 100 $\mu$ M)<br>Опрыскивание 20-дневных растений перед стрессовой обработкой                               | Засуха: (относительная влажность грунта 20%)   | Смягчение негативных эффектов стресса на ростовые параметры (сырая, сухая масса растений, площадь листьев), поддержание фотосинтетической активности и состояния водного режима растений   | [83]   |
| Сахарный тростник ( <i>Saccharum spp.</i> ) | GSNO (10, 100, 500 $\mu$ M)<br>Опрыскивание листьев 25-дневных растений за 3 сут до стресса                             | Осмотический стресс PEG 8000 (-0.75–0.111 mPa)   | Улучшение показателей роста (сырая и сухая масса листьев и корней), водного режима (ОСВ; устьичной проводимости), ассимиляции CO <sub>2</sub> , поддержание фотосинтетической активности   | [84]   |
| Соя ( <i>G. max</i> )                       | SNP (100 $\mu$ M)<br>Опрыскивание растений в течение 21 сут   | 15% PEG 6000   | Поддержание роста, смягчение окислительного стресса (снижение уровня MDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , экзоосмоса электролитов, активности LOX). Активация антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, POX, APX), накопление неферментативных антиоксидантов (фенольных соединений, флавоноидов, токоферолов). Накопление осмопротектантов (пролин, глицинбетаин)                  | [88]   |
| Рис ( <i>O. sativa</i> L.)                  | SNP (50, 100, 150 $\mu$ M)<br>1. Предпосевное замачивание семян;<br>2. Опрыскивание растений на стадии 5 листьев        | Засуха: (относительная влажность грунта 50%; ограниченный полив растений на стадии 4х листьев) | Снижение негативного действия засухи на ростовые параметры, состояние водного режима растений риса. Снижение уровня окислительных повреждений, повышение стабильности мембранных структур и фотосинтетической активности   | [89]   |
| Люцерна ( <i>M. sativa</i> L.)              | SNP (100 $\mu$ M)<br>Предпосевное замачивание семян с последующим проращиванием в течение 7 сут в присутствии донора NO | Дефицит влаги (присутствие 10% PEG 6000 в среде проращивания)                                  | Поддержание роста, водного статуса и уровня хлорофилла. Усиление накопления пролина и активности антиоксидантных ферментов (SOD, POD, CAT, APX). Модуляция экспрессии чувствительных к засухе генов: транскрипционных факторов, фотосинтетических белков, генов редокс-гомеостаза (GST, SOD, GPX, RBON) и генов, вовлекаемых в сигналинг фитогормонов (АБК, этилена, ауксинов) | [93]   |



ствование окислительного аргинин-зависимого пути биосинтеза NO, для которых специфические ферменты еще только предстоит идентифицировать [4, 22].

Восстановительные механизмы связаны с реакциями восстановления нитрата при участии нитратредуктазы (NR – nitrate reductase). Этот фермент катализирует первую стадию ассимиляции азота – реакцию двухэлектронного восстановления нитрата ( $\text{NO}_3^-$ ) до нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), который далее с участием ассимиляторной нитритредуктазы (NiR – nitrite reductase) восстанавливается до аммония, необходимого для синтеза аминокислот. Вместе с тем NR способна катализировать реакцию одноэлектронного восстановления нитрита с образованием NO [24, 25]. Суммарно процесс восстановительной продукции NO можно условно выразить в виде двух уравнений:



NR-зависимое образование NO было выявлено у разных видов растений [4, 24, 26]. В модельном растительном объекте *Arabidopsis thaliana* идентифицировано две изоформы фермента NR1 и NR2, кодируемые генами *NIA1* и *NIA2* [25]. Растения с оверэкспрессией *NIA1* и *NIA2* генов и накоплением соответствующих NR1 и NR2 белков характеризовались значительным повышением продукции NO [27].

Участие NR в процессе образования NO может быть связано не только с ее нитрит восстанавливающей активностью, но также со способностью передавать электроны на другой фермент амидоксимредуктазу (mARC – mitochondrial Amidoxime Reducing Component), непосредственно катализирующий реакцию восстановления  $\text{NO}_2^-$  до NO. Поэтому mARC растений предложено обозначать с использованием аббревиатуры NOFNiR (NO forming nitrite reductase), а саму двухкомпонентную NO-продуцирующую систему, образованную NR совместно с mARC в виде записи NR:NOFNiR [24, 28]. Потенциальной способностью восстанавливать нитрит до NO обладают три других фермента: сульфитоксидаза (SO), ксантиноксидоредуктаза (XOR) и альдегидоксидаза (AO), поэтому их наряду с NR и mARC предложено объединить в самостоятельный класс “неспецифических NO-образующих нитритредуктаз” [26]. Кроме того, восстановительная продукция NO может протекать в митохондриях с участием ЭТЦ митохондрий, а также в хлоропластах, пероксисомах и апопласте [4, 14, 22].

Поддержание гомеостаза NO в растениях осуществляется путем его депонирования в виде S-нитрозоглутатиона (GSNO) или в форме нитро-

ро-жирных кислот ( $\text{NO}_2\text{-FA}$  – Nitro-fatty acids) [29, 30]. Свой вклад в регуляцию эндогенного уровня NO вносят фитоглобины, принадлежащие к семейству несимбиотических гемоглобинов, которые способны передавать атом кислорода на молекулу NO с образованием нитрита, выступая, таким образом, в качестве своеобразных “тушителей” NO [3, 31]. Существование такого разнообразия метаболических процессов, связанных с поддержанием гомеостаза NO в растениях объясняется их потребностью в поддержании базового уровня NO, выполняющего чрезвычайное множество регуляторных функций в ходе их нормального развития и адаптации к меняющимся условиям среды [4].

## 2. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ NO В РАСТЕНИЯХ

**Современные подходы к изучению NO.** Исследование функциональной активности NO в растительных объектах проводится с помощью широкого арсенала методов, включая фармакологические, генетические подходы, качественные и количественные методы оценки эндогенного NO [12]. Фармакологические подходы связаны с экзогенной обработкой растений донорами NO. Для этого чаще всего используются нитропруссид натрия SNP (sodium nitroprusside), S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) и S-нитрозоглутатион GSNO (S-nitrosoglutathione). Дополнительным доказательством проявления конкретных эффектов доноров NO служат данные, полученные с параллельным применением скавенджеров и/или ингибиторов эндогенной продукции NO [16]. К скавенджерам NO относятся РТИО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) и его производное – сРТИО (2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide). Ингибиторами продукции NO являются вольфрамат натрия ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) и L-NAME ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester), угнетающими восстановительные и окислительные реакции образования NO, соответственно [14, 16, 20]. Применение доноров позволяет имитировать эффекты NO в растениях. Вместе с тем эндогенная продукция NO может модулироваться с помощью генетических технологий, основанных на получении мутантных и трансгенных линий растений с измененной продукцией NO. Важные сведения о механизмах продукции и функциональной активности NO были получены с использованием таких линий [15, 32].

У модельного растительного объекта *A. thaliana*, описаны *nia1* и *nia2* мутанты с дефектами по *NIA1* и *NIA2* генам, кодирующим две изоформы нитратредуктазы NR1 и NR2, соответственно, а также двойные мутанты *nia1nia2*. С их помощью было установлено участие NR в реакциях образования

NO, и его вовлечение в протекание процессов формирования корней, инициации цветения и в регуляцию устьичных движений [24, 25, 27]. Центральная роль NR в нитрит-зависимой продукции NO была подтверждена в экспериментах с трансгенными линиями *A. thaliana*, характеризующимися повышенной продукцией NO, обусловленной оверэкспрессией *NIA1* и *NIA2* генов [27]. Пониженными уровнями эндогенного NO характеризуются *noa1* мутанты *A. thaliana* по гену NOA1-белка (Nitric oxide-associated protein 1), который ранее рассматривался в качестве растительной NO-синтазы. В последующем было установлено, что данный белок NOS-ферментом не является, а принадлежит к числу ГТФ-аз и оказывает плейотропное влияние на растительный метаболизм, в том числе на окислительную продукцию NO. В связи с чем *noa1* мутанты широко применяются для исследования регуляторной роли NO в растениях [15, 33]. Тройные *nia1nia2noa1* мутанты *A. thaliana* с дефицитной NO-продукцией проявляют гиперчувствительность к недостатку влаги, связанную с нарушениями АБК-контролируемых устьичных движений, что подтверждает важную роль NO в регуляции засухоустойчивости растений [15, 34].

Для *A. thaliana* охарактеризованы *nox1* мутантные линии с повышенной продукцией NO с дефектами по гену CUE1 (chlorophyll a/b binding protein underexpressed 1), кодирующему хлоропластный фосфоенолпируват/фосфат транслокатор [35]. В этих мутантах выявлено повышенное содержание аргинина, чем, по-видимому, обуславливается сверхпродукция в них оксида азота, однако CUE1-зависимый механизм образования NO пока не понятен [32]. Тем не менее, *nox1* линии были успешно использованы в протеомных исследованиях, проведенных с помощью двумерного электрофореза с последующим MALDI-TOF MS-анализом при изучении профиля и идентификации NO-модулируемых белков [32, 35]. С помощью других мутантных линий *gsnor1-3* с повышенным содержанием NO, дефицитных по S-нитроглютамин редуктазе (GSNOR), исследовалась роль процесса S-нитрозилирования в регуляции активности различных белков [17]. В частности, было установлено, что при S-нитрозилировании модулируется активность NADPH-оксидазы, задействованной в программируемой клеточной смерти [36], NPR1-белка, активирующего экспрессию генов защитных белков при инфицировании патогенами [17], и SnRK2-протеинкиназы, вовлекаемой в АБК-зависимое NO-опосредованное закрытие устьиц [37].

К настоящему времени получены трансгенные линии *A. thaliana* с конститутивной экспрессией гена нейронной NO-синтазы крыс (*nNOS*) [38], гена *OtNOS* NO-синтазы водорослей *Ostreococcus tauri* [39] и линии *O. sativa*, экспрессирующие *nNOS*

ген млекопитающих [40]. С использованием этих трансгенов проводились экспериментальные работы, по выявлению роли NO в развитии устойчивости растений к окислительному стрессу, засухе и засолению [15, 32, 38–40].

Среди количественных методов оценки эндогенного NO наиболее давним и хорошо известным способом является метод Грисса, основанный на образовании азоткрасителя с максимумом поглощения при 540 нм, которое оценивают спектрофотометрически [20, 41]. Большой массив данных получен с помощью электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР), газовой хроматографии, прямой и непрямой хемилюминисценции [16]. Для детекции NO посредством конфокальной микроскопии используются флуоресцентные красители диаминофлуоресцины (DAFs) и их различные модификации, которые позволяют четко отслеживать изменения уровня эндогенного NO и выявлять места его образования в растительных тканях [12, 20].

## 2.1. УЧАСТИЕ NO В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

В настоящее время получен большой массив данных, указывающих на выполнение оксидом азота кардинально важных функций в ходе всего жизненного цикла растений на разных стадиях их развития в нормальных условиях произрастания. Доказано его участие в регуляции покоя и прорастания семян, клеточного цикла, вегетативного роста, дифференциации тканей, формирования архитектуры корней, развития симбиотических связей, цветения и созревания плодов [8, 18, 42].

Оксид азота характеризуется ярко выраженной способностью индуцировать прорастание семян, стимулируя выведение их из состояния покоя, которое было продемонстрировано на примере разных растительных объектов (табл. 1), в частности *A. thaliana*, ячменя *Hordeum vulgare* L. [43], салата *Lactuca sativa* [44], пшеницы *Triticum aestivum* L. [45]. На примере *L. sativa* было показано, что индуцирующий прорастание семян эффект доноров SNP или SNAP носил дозозависимый характер и нивелировался при использовании NO-скавенджера cPTIO [44]. Обработка семян нута *Cicer arietinum* донорами NO вызывала в них индукцию экспрессии генов гексокиназы 1, фосфофруктокиназы 6, пируват-киназы,  $\alpha$ -амилазы, связанных с утилизацией сахаров, и активацию генов циклинов (*cyclin-D4-1-like* и *cyclin-B1-4-like*), задействованных в процессе регуляции клеточного цикла [46]. Тогда как в семенах пшеницы под влиянием экзогенного NO наблюдалось повышение ферментативной активности  $\beta$ -амилазы и уровня окисления NADPH, чем обуславливается усиление процессов гидролиза полисахаридов и пентозофосфатного пути катаболизма глюкозы,

соответственно, что в целом могло найти свое отражение в стимуляции прорастания семян [8, 47]. NO-индуцированное усиление активности  $\beta$ -амилазы и стимуляция прорастания наблюдалась также при обработке семян ячменя (*Hordeum vulgare* L.), сои (*Glycine max* L.), риса (*Oryza sativa* L.), кукурузы (*Zea mays* L.), резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* L.), арбуза (*Citrullus vulgaris*), рапса (*Brassica napus* L.), индийской горчицы (*Brassica juncea* L.) [47].

Первые сведения о вовлечении NO в регуляцию вегетативного роста были получены почти три десятилетия назад, когда была выявлена одновременная эмиссия NO и этилена стареющими листьями гороха [48]. При этом в низких концентрациях оксид азота снижал ингибирующее действие дефицита влаги на рост листьев. Благоприятное действие NO на рост листьев объяснялось его способностью понижать уровень содержания в них этилена [8, 48]. Инкубирование кончиков корней 3-суточных проростков кукурузы в присутствии различных доноров NO, включая SNP, GSNO, нитрит натрия и нитроцистеин, стимулировало их элонгацию (табл. 1) [8, 49]. NO индуцировал деэтиолирование гипокотилия растений салата, подавляя при этом увеличение его линейных размеров [44]. Присутствие в среде прорастания SNP в концентрациях от 50 до 200  $\mu$ M способствовало увеличению линейных размеров 4-суточных проростков пшеницы и активации процессов клеточного деления, о чем свидетельствовали показатели митотического индекса апикальной меристемы корней [45]. В пользу выполнения важной роли NO в регуляции процессов вегетативного роста служат данные о дефектах в развитии корней, замедлении роста побегов и нарушении цветения у *Atnoa1* мутантных линий *A. thaliana*, характеризующихся сниженной продукцией NO [15, 33].

При исследовании участия NO в регуляции процессов цветения было выявлено его омолаживающее действие, которое проявляется в торможении перехода растительного онтогенеза от стадии вегетативного роста к репродуктивной фазе развития. В пользу омолаживающих эффектов оксида азота служат данные о более позднем зацветании сверх продуцирующих NO *nox1*-мутантных линий *A. thaliana* [35], а также данные об ускоренном переходе к процессу цветения NO-дефицитных *nos1*-мутантов *A. thaliana* [50]. При регуляции цветения NO играет роль ключевого компонента в процессах восприятия фотопериода, роста и взаимной ориентации микропиле и пыльцевых трубок [51]. Омолаживающий эффект NO при цветении может быть связан с его антиоксидантной активностью. Оказывая влияние на продукцию аскорбата, а также на активность ксантиноксидазы и супероксиддисмутазы в цветках, катализирующих реакции распада перекиси и нейтрализации супероксид аниона, NO может способствовать торможению процессов старения,

и увеличивать продолжительность периода цветения [8]. Такие эффекты NO могут представлять практический интерес для декоративного цветоводства [18].

NO вносит важный вклад в процессы роста и развития корневой системы, выполняя роль ключевого интермедиата в ауксин-зависимой регуляции формирования архитектуры корней [8, 18, 52, 53]. Обработка донором NO растений томата и огурца оказывала на них ауксин-подобный эффект, который проявлялся в увеличении степени разветвленности корневой системы, связанной с активацией роста боковых и придаточных корней на фоне замедления роста первичного корня (табл. 1) [52, 53]. С помощью ОТ-ПЦР анализа было выявлено, что под влиянием NO обработки в отрезках корней томата происходило усиление экспрессионной активности генов циклинов *CYCD3;1* и *CYCA2;1*, связанных с процессами клеточного деления, что может играть свою роль в NO-зависимых процессах корнеобразования [54]. На тесное взаимодействие NO с ауксинами при регуляции развития корневой системы указывают данные об ингибировании ИУК-зависимого образования придаточных корней в растениях огурца под влиянием скавенджера NO [8]. В растениях салата NO индуцировал дифференциацию специфических клеток эпидермиса – трихобластов с образованием корневых волосков. Увеличение уровня NO в корневых волосках салата при обработке 1-нафтил уксусной кислотой (НУК) подтверждает его участие в контролируемых ауксинами процессах корнеобразования [18, 55].

Учитывая тот факт, что формирование корневой системы осуществляется с участием NO, становится ясной его роль в регуляции процессов минерального питания. Имеются сведения о вовлечении NO в регуляцию гомеостаза макро- и микроэлементов, включая азот (N), фосфор (P), калий (K), магний (Mg), цинк (Zn), железо (Fe) и т.д. [18]. Экзогенная NO обработка растений кукурузы способствовала предотвращению индуцируемого дефицитом железа развития хлороза листьев (табл. 1), что может быть связано с активацией под его влиянием экспрессии генов хлоропластных белков: *rbcL* (Rubisco large subunit) и *psbA* (D1 protein) [56]. У растений томата при нехватке железа в клетках эпидермиса корней наблюдался быстрый синтез NO, который вовлекался в регуляцию экспрессии генов *LeFER*, *LeFRO1*, *LeIRT1*, задействованных в процессе поглощения железа [57, 58]. Аналогичный эффект NO на активность генов, связанных с усвоением железа, был выявлен в растениях огурца [58]. Экзогенная NO-обработка китайской капусты *Brassica chinensis* L. снижала ингибирующее действие дефицита железа на протекание реакций фотосинтеза [59]. Оксид азота способствовал ремодуляции структуры корней в условиях дефицита фосфора или калия,

усиливая их поступление в ткани растений [60]. На примере *Lupinus albus* было показано, что в условиях дефицита фосфора NO повышает уровень экссудации цитратов, способствуя солиubilизации фосфатов в почве и улучшению усвоения фосфора растением [61]. Имеются сведения о повышении уровня NO в клетках в условиях дефицита калия [18, 62]. В растениях *A. thaliana* NO, генерируемый в ответ на нехватку калия, вовлекался в регуляцию активности K<sup>+</sup>-каналов (AKT1), что может вносить свой вклад в поддержание гомеостаза калия в растительной клетке [63, 64]. Взаимосвязь NO с азотным питанием растений в настоящее время не вызывает сомнений, поскольку одним из основных источников его образования в растительных организмах являются нитрат/нитрит-зависимые пути, в которых центральную роль играет ключевой фермент азотного обмена – ассимиляторная NR [4]. NO находится в центре тонкой настройки гомеостаза азота, поскольку NO, продуцируемый в ходе реакций ассимиляции нитрата, может модулировать активность нитратных транспортеров, регулируя скорость поступления нитратов в корни растений [25]. Кроме того, NO играет множественные функции в регуляции растительно-микробных взаимодействий и установлении симбиотических связей [8, 18].

Одним из первых доказательств участия NO в симбиотических взаимодействиях относят данные электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) об образовании нитрозил-леггемоглобиновых (NO-Lbs) комплексов в клубеньках корней сои и нута [65]. В последующем было показано, что взаимодействие NO с леггемоглобинами клубеньков индуцировалось при обработке этих растений растворами нитритов [66]. К образованию NO-Lbs комплексов были способны только молодые активно метаболизирующие клубеньки, поскольку в состарившихся структурах такие комплексы не выявлялись [65–67]. В пользу участия NO в симбиотических взаимодействиях свидетельствуют данные о проявлении NOS-подобной активности в клубеньках люпина белого *Lupinus albus* [8, 68]. Получены сведения об инициации симбиоза у люцерны *Medicago truncatula* под влиянием растительной NOS-подобной и NR-активности, тогда как бактериальная NOS- и NR-активности, а также дыхательная цепь N<sub>2</sub>-фиксирующих бактерий служили в качестве дополнительных источников NO в процессе развития симбиотических связей [69]. Установлено, что липополисахариды, синтезируемые на поверхности клеток *Mesorhizobium loti*, необходимые для растительно-ризобиального распознавания в корнях растений *Lotus japonicus*, являются NO-индуцируемыми факторами [70]. Регуляторная роль NO выявлена при разных типах симбиозов, например, при актиноризобиальном взаимодействии в корнях ольхи *Alnus* sp., симбиотическом взаимодействии в про-

цессе регидратации лишайника, а также микоризобиальном симбиозе у оливы [8, 71–73].

Таким образом, оксид азота играет важную роль в регуляции жизнедеятельности растений на разных стадиях их развития, а также при взаимодействии с симбионтами, подтверждая тот факт, что NO является обязательным участником реализации физиологических программ в нормальных условиях произрастания. Вместе с тем к настоящему времени получены многочисленные данные о вовлечении NO в формирование устойчивости растений к стрессовым факторам биотического и абиотического происхождения, что представляет большой практический интерес. Для обоснования применения NO на практике с целью повышения устойчивости и урожайности культурных растений необходимо понимание механизмов его защитного действия в растительных организмах. Поскольку среди абиотических стрессовых факторов наиболее широко распространены засуха, засоление, гипо- и гипертермия, вызывающие нарушение водного режима и обезвоживание растений, приводящих к существенному ограничению их продуктивности, особый интерес представляет рассмотрение защитного действия NO на растения при воздействии дефицита влаги [15, 16, 32].

## 2.2. ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ NO В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ

Данные о повышении продукции NO в растительных организмах при воздействии водного стресса и активации в них защитных программ под влиянием экзогенной NO-обработки свидетельствуют в пользу его участия в развитии устойчивости к условиям дефицита влаги. В частности, индуцированное засухой усиление синтеза NO было продемонстрировано у растений пшеницы, петрушки *Petroselinum crispum* [74], ячменя [75], риса [40], в разных представителях бобовых [76], в модельном растительном объекте *Arabidopsis thaliana* [63] и многих других видах растений [14, 16, 17]. Защитное действие NO может быть связано с активацией осмопротекторной, а также антиоксидантной системы защиты растений, способствующей снижению уровня стресс-индуцированного образования активных форм кислорода (АФК), и реализуется на молекулярном уровне путем нитрования различных биополимеров, которое приводит к изменению их пространственной конфигурации и функциональной активности. Так, нитрование могут претерпевать белковые факторы транскрипции, обуславливающие NO-зависимые перестройки в экспрессионной активности множества NO-индуцируемых генов [4, 14, 16–18].

**Проявление защитного действия NO на физиологическом уровне.** На физиологическом уровне действие засухи, а также засоления, неблагоприятных температур, ионов тяжелых металлов ска-

зывается на состоянии водного режима растений [16, 17]. Его регуляция тесно связана с функционированием устьиц, выполняющих главную роль в процессе транспирации. Возникающие при стрессе сдвиги между уровнем транспирации и поступлением воды приводят к развитию водного дефицита, в результате которого происходит изменение таких показателей водного режима, как относительное содержание воды (ОСВ), оводненность, водоудерживающая и водопоглощающая способность тканей и органов растений [13]. При действии мягкой засухи устьичная проводимость и интенсивность транспирации могут возрастать. В условиях сильного стресса устьица быстро закрываются [13, 16]. Эта защитная реакция, направленная на ограничение потери воды в растениях, регулируется сложной сетью сигнальных путей, контролируемых гормональной системой, преимущественно АБК, и осуществляется с участием SnRK2-протеин киназы [16, 37].

Оксид азота выступает важным участником АБК-контролируемого каскада сигнальных реакций, приводящих к закрытию устьиц в условиях водного стресса (табл. 1). Об этом свидетельствуют данные, полученные с использованием NO-дефицитных *Atnoa1* или *nia Inia2* мутантов *A. thaliana*, не способных к АБК-индуцированному закрытию устьиц [10, 34]. В модельных опытах с использованием отрезков эпидермиса *Vicia faba* была выявлена повышенная продукция NO в замыкающих клетках устьиц при их закрытии в темноте, которое значительно снижалось при обработке скавенджером NO – сРТЮ [77]. Продукция NO в устьичных клетках при воздействии засухи, а также при обработке АБК была выявлена в растениях *Medicago truncatula* [76], *Phaseolus vulgaris* и *Vigna unguiculata* [78]. В растениях *Vitis vinifera* увеличение продукции NO коррелировало со снижением устьичной проводимости при засухе [79]. Экзогенная SNP-обработка подавляла открытие устьиц на отрезках эпидермиса *Salpichroa organifolia* и *Tradescantia* spp, которое нивелировалось при использовании скавенджера NO (сРТЮ) [80, 81]. Вовлекаясь в регуляцию устьичных движений, NO способен оказывать влияние на другие параметры водного режима растений. Так, SNP-предобработанные растения индийской горчицы *Brassica juncea* при ПЭГ-индуцированном обезвоживании характеризовались улучшением показателей эффективности использования воды, что способствовало поддержанию ростовых параметров и более высокому уровню накопления ими биомассы в отличие от растений, необработанных донором NO [82]. Опрыскивание листьев растений физалиса SNP в концентрациях от 25 до 100 мкМ способствовало поддержанию в них относительного содержания воды (ОСВ) и фотосинтетической активности при воздействии полевой засухи, что отразилось на улучшении показателей ростовых

параметров [83]. Аналогичные результаты были получены на примере растений сахарного тростника *Saccharum* spp., в которых NO-индуцируемое поддержание ОСВ в корнях в условиях водного стресса сопровождалось повышением в них уровня фотосинтетической активности и накоплением сырой и сухой массы [84].

**Проявление защитного действия NO на биохимическом уровне.** На биохимическом уровне действие обезвоживания негативно отражается на протекании разных звеньев метаболизма, среди которых принципиальное значение имеет процесс фотосинтеза. Снижение скорости фотосинтеза может быть следствием уменьшения площади листа, недостатка CO<sub>2</sub> в листьях, вызванного закрытием устьиц и нарушением реакций его ассимиляции, подавления синтеза хлорофиллов, каротиноидов и добавочных пигментов, разобщения процессов транспорта электронов и фотофосфорилирования, изменений в структуре хлоропластов [16]. Экспериментально доказано участие NO в поддержании активности фотосинтеза и сохранении целостности фотосинтетического аппарата у подвергнутых водному стрессу растений (табл. 1) [14, 16]. В этой связи следует напомнить, что важным сайтом продукции NO в клетках являются хлоропласты [4, 85]. В фотосистеме II (ФСII) выявлены участки взаимодействия с NO, локализованные между первичными и вторичными акцепторами электронов хиноновой природы [14, 85]. Водный стресс индуцирует диссоциацию базовых белковых комплексов в ФСII, дестабилизируя их структуру и вызывая нарушения в протекании фотосинтетических реакций. Одним из механизмов NO-опосредованной защиты фотосинтетического аппарата является участие NO в стабилизации структуры функциональных белков ФСII при засухе [14]. Наряду с этим NO вовлекается в регуляцию активности генов, связанных с фотосинтезом, в частности *psbA* гена пшеницы, кодирующего D1 белок в ФСII. Показано, что поддержание процесса новообразования D1 белка способствовало репарации инактивированных реакционных центров ФСII и нормальному протеканию фотосинтетических реакций на стадии налива зерна в растениях пшеницы [14, 86].

Торможение фотосинтетических реакций также может обуславливаться ингибированием активности ключевых ферментов фотосинтеза вследствие АФК-индуцируемых конформационных нарушений их белковых молекул. Ограничение поступления CO<sub>2</sub> при засухе приводит к снижению уровня восстановления NAD(P)<sup>+</sup> до NAD(P)H в хлоропластах, вызывая усиление потока электронов на молекулярный кислород (O<sub>2</sub>), которое сопровождается повышением продукции супероксид-аниона (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Его быстрая дисмутация приводит к образованию множества других форм АФК, на-

пример, гидроксильного радикала ( $\text{OH}^\bullet$ ), перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ), обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью [87]. При избыточной продукции АФК начинают самопроизвольно и неспецифически взаимодействовать с различными молекулярными компонентами клетки, вызывая серьезные повреждения структуры и функций биомембран, изменения пространственной организации белков и нуклеиновых кислот [17, 87]. Негативным последствием конформационных изменений белковых молекул ферментов становится нарушение их функциональной активности, как это было выявлено для ферментов, катализирующих реакции цикла Кальвин-Бенсона, включая рибулозо-1.5-бисфосфаткарбоксилазу/оксигеназу RuBisCo (ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) и фосфоррибулокиназу PRK (phosphoribulokinase) [82]. Кроме того, вызывая фрагментацию молекул ДНК, АФК индуцируют процессы мутагенеза и остановку клеточного цикла, что приводит к гибели клеток и всего организма в целом [16, 82]. Нейтрализация АФК осуществляется с участием антиоксидантной системы, включающей ферментативные и неферментативные компоненты [14, 16, 17, 87]. К антиоксидантным ферментам относятся, в частности, супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), пероксидаза (POD), аскорбатпероксидаза (APX), полифенолоксидаза (PPO) и др. К числу антиоксидантов неферментативной природы принадлежат токоферолы, каротиноиды, аскорбиновая кислота, полиамины, некоторые белки, пептиды и аминокислоты, например глутатион и пролин [16, 17].

Роль NO в смягчении негативных эффектов АФК, продуцируемых при засухе, была продемонстрирована в многочисленных экспериментальных работах (табл. 1). Было выявлено снижение продукции свободных липидных радикалов ( $R^\bullet$ ), супероксид аниона ( $\text{O}_2^-$ ), перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и других свободно-радикальных молекул под влиянием NO [14, 16, 17, 81]. Опрыскивание проростков сои *Glycine max* раствором SNP (100  $\mu\text{M}$ ) способствовало их защите от окислительных повреждений при воздействии обезвоживания (10% или 15% PEG), о чем свидетельствовали данные по снижению аккумуляции в проростках перекиси и МДА, активности липоксигеназы (LOX) и уровня экзосмоса электролитов [88]. Кроме того, NO-обработанные растения сои характеризовались повышением активности антиоксидантных ферментов SOD, CAT, POD, APX, PPO. В спектр NO-индуцируемых защитных реакций растений сои от окислительных повреждений при обезвоживании могут вовлекаться вторичные метаболиты, поскольку NO-обработка проростков *Glycine max*

способствовала дополнительному накоплению при стрессе полифенолов, флавоноидов и токоферолов, а также активации ферментов фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) и тирозин-аммиак-лиазы (TAL), вовлекаемых в биосинтез фенольных соединений и флавоноидов [88]. Имеются данные, что снижение АФК-индуцируемого уровня перекисного окисления липидов в проростках люцерны *Medicago sativa* L. может быть опосредовано через MAPK-зависимую экспрессию генов антиоксидантных ферментов [38]. Предполагается, что активность SOD, CAT, APX, дегидроаскорбатредуктазы может регулироваться через механизм S-нитрозилирования, что может играть свою роль в защите клеточных структур под влиянием NO [17, 38, 89]. Кроме того, NO может оказывать стабилизирующее действие на фосфолипиды мембран, обуславливая поддержание их текучести и эластичности в неблагоприятных условиях [18, 90].

Устойчивость растений к засухе во многом определяется их способностью к осморегуляции, связанной с активностью осмопротекторной системы, функционирующей при участии различных осмотически активных соединений, к числу которых принадлежит гетероциклическая иминокислота пролин [91]. Он характеризуется выполнением множественных защитных функций при обезвоживании растительной клетки. Хорошо известна роль пролина в поддержании функциональной активности белоксинтезирующего аппарата [14, 91]. К настоящему времени получены сведения об усилении индуцируемого засухой синтеза пролина под влиянием NO в разных культурах, например в растениях пшеницы и риса [14, 86, 89]. Конститутивная экспрессия кодирующего NO-синтазу крысы (nNOS) трансгена в растениях *Oryza sativa* сопровождалась повышением уровня накопления пролина, индуцированного при воздействии засухи или засоления [40]. Усиление синтеза пролина под влиянием NO в условиях дефицита влаги также выявлялось в других видах растений, как например, *Glycine max*, *Lycopersicon esculentum*, *Ginkgo biloba*, *Triticum aestivum* (табл. 1) [15, 88]. Вместе с тем нужно отметить, что в нормальных условиях произрастания SNP, как правило, не оказывает существенного влияния на содержание пролина. Существует мнение, что NO-индуцированное накопление пролина носит, вероятно, стрессо-специфический характер и зависит от степени стрессовой нагрузки. Для установления роли NO в регуляции синтеза пролина и проявления его защитных свойств в растениях в норме и при воздействии стрессовых факторов необходимо проведение дополнительных исследований [14, 15]. Другим важным осмопротектантом растений является глицин-бетаин (GB), который может быть участником NO-зависимых защитных реакций. В пользу этого предпо-

ложения свидетельствуют результаты опытов, в которых было показано, что опрыскивание листьев кукурузы донором NO стимулировало в них активацию бетаин-альдегид дегидрогеназы и накопление самого GB [15, 92]. Аналогичные данные были получены на примере растений сои, подвергнутых водному стрессу, в которых дополнительная аккумуляция GB наблюдалась вследствие SNP-обработки (табл. 1) [88].

### 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯТОРНОГО И ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ NO

Процессы NO-зависимого сигналинга реализуются в растениях на геномном, протеомном и пост-протеомном уровнях в ходе множественных реакций нитрования, осуществляемых с участием различных нитрирующих агентов (АФА, GSNO, пероксинитрит, нитрожирные кислоты) [14, 16, 20]. В пользу участия NO в регуляции растительного метаболизма на геномном уровне свидетельствуют данные, полученные с использованием трансгенных линий *A. thaliana*, экспрессирующих нейронную NO-синтазу млекопитающих (nNOS), которые характеризовались повышением транскрипционной активности 184 генов и ее угнетением более чем у 200 генов [38]. В ходе проведения транскриптомного анализа в растениях люцерны *Medicago sativa* L., подвергнутых действию обезвоживания (10% PEG), обработанных или необработанных донором NO (SNP 150  $\mu$ M), была выявлена дифференциальная экспрессия более 2000 генов, среди которых свыше 800 были отнесены к разряду NO-модулируемых [16, 93].

NO способствовал дополнительному повышению активности генов факторов транскрипции, принадлежащих к семействам MYB, bHLH, bZIP, HSF и HB, выполняющих функции регуляторов стрессового ответа у растений [15, 16, 93]. В ответ на NO-обработку наблюдалось усиление транскрипционной активности генов, вовлекаемых в сигналинг фитогормонов (АБК, этилен, ауксины). Так, в подвергнутых обезвоживанию проростках под влиянием NO происходило повышение экспрессии генов рецепторов АБК семейства *PYL* (pyrabactin resistance-like) и гена SnRK2-протеинкиназы, функционирующей при в АБК-контролируемом закрытии устьиц [37, 93]. SNP-обработка снижала экспрессионную активность генов этиленового сигналинга, например генов *ETR1* (ethylene receptor 1), *ERF1* (ethylene response factor1), указывая на то, что NO может выступать антагонистом этилена при воздействии водного стресса [93]. NO нивелировал ингибирующее действие засухи на экспрессию чувствительных к ауксину генов семейства *SAUR* (small-auxin-up-RNAs), с чем может быть связано положительное влияние NO на ростовые процессы [93]. SAUR-

белки функционируют в качестве позитивных эффекторов при ауксин-зависимом растяжении клеток и стимуляции ростовых процессов [16].

Под влиянием NO происходило повышение активности генов антиоксидантных ферментов *GST* (glutathione S-transferase), *POD* (peroxidase), *CAT* (catalase), *SOD* (superoxide dismutase) и *GPX* (glutathione peroxidase). Наряду с этим NO снижал экспрессионную активность гена *RBOH*-оксидазы, являющейся компонентом АФК-генерирующей системы. NO-индуцируемое усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов и снижение активности *RBOH*-гена сопровождалось снижением степени окислительных повреждений в проростках люцерны при воздействии обезвоживания (табл. 1) [93]. Интересно, что NO-обработка проростков *M. sativa* снижала в них уровень стресс-индуцируемой экспрессии генов биосинтеза вторичных метаболитов (флавоноидов, терпеноидов, фенилпропаноидов), обладающих антиоксидантными свойствами. По мнению авторов это могло быть связано с уменьшением уровня окислительных повреждений, обусловленным усилением экспрессионной активности генов антиоксидантных ферментов под влиянием NO, при котором дополнительного участия вторичных метаболитов для антиоксидантной защиты проростков люцерны уже не требуется [93]. Вместе с тем данные о дополнительном NO-индуцированном накоплении фенолов, флавоноидов и токоферола в проростках *Glicine max* при воздействии обезвоживания, а также сведения о повышении в них активности TAL- и PAL-ферментов, указывают на высокую вероятность участия вторичных метаболитов в NO-контролируемых защитных реакциях растений сои к дефициту влаги [88]. В трансгенных растениях риса *O. sativa* с конститутивной экспрессией NOS-гена млекопитающих наблюдалось усиление экспрессионной активности генов каталазы (*OsCATA* и *OsCATB*) и пероксидазы (*OsPOXI*) [40]. SNP-обработка люцерны оказывала позитивное влияние на экспрессионную активность генов, кодирующих компоненты фотосистем (ФС), например *Psa*- и *Psb*-генов реакционных центров, а также *Lcha*- и *Lchb*-генов светособирающих комплексов ФС I и ФС II, соответственно, что могло найти свое отражение в поддержании уровня хлорофилла, фотосинтетической активности и в целом улучшении ростовых параметров растений, подвергнутых водному стрессу (табл. 1) [16, 93].

В литературе имеются сведения об усилении экспрессии генов, вовлекаемых в продукцию NO под влиянием дефицита влаги. Например, в листьях растений *Citrus aurantium* при воздействии засухи повышалась транскрипционная активность генов нитратредуктазы (NR), нитритредуктазы (NiR) и полиаминооксидазы (POA) [94]. На примере растений индийской горчицы *Brassica jun-*

*cea*, пекинской капусты *Brassica rapa*, риса *Oryza sativa*, было показано участие NO в стабилизации структуры ДНК при воздействии водного стресса, что может способствовать поддержанию активности генетического аппарата в условиях засухи [16, 82].

Реализация сигнальных функций NO на протеомном уровне связана с NO-индуцированными посттрансляционными модификациями белков (ПТМ), которые могут осуществляться путем их нитрозилирования с участием пероксинитрита или S-нитрозоглутатиона (GSNO) [20, 95]. Среди ПТМ наиболее хорошо изученными являются S-нитрозилирование и нитрование по тирозину [14, 16, 20, 29]. NO может регулировать функционирование металл-содержащих белков в ходе реакции металл-нитрозилирования, которая заключается в присоединении нитро (NO<sub>2</sub>)-группы к иону металла в составе различных белков, в том числе ферментов, модулируя тем самым их активность [25, 95]. Нитрование по тирозину происходит при взаимодействии нитро-группы с ароматическим кольцом тирозина, приводящим к образованию 3-нитротирозина (NO<sub>2</sub>-Tyr) [20, 29]. Ранее считалось, что такая модификация является необратимой и обуславливает деградацию белков при старении или гибели клеток. Поэтому продукцию NO<sub>2</sub>-Tyr, как правило, рассматривали в качестве маркера нитро-окислительного стресса [14, 20]. Однако, к настоящему времени полученные сведения, что нитрование по тирозину может носить обратимый характер и в этом случае денитрификация белков протекает неферментативно или с участием ферментов [29]. Нитрование белков по тирозину является важным условием в процессе созревания плодов, как это было наглядно продемонстрировано у растений перца [96].

S-нитрозилирование происходит при обратимом взаимодействии NO с атомом серы в составе цистеиновых остатков белков с образованием S-нитрозотиолов (SNOs). В растениях идентифицировано множество белков, претерпевающих S-нитрозилирование. Например, S-нитрозилирование SnRK2-протеинкиназы способствует снижению ингибирующего эффекта АБК при прорастании семян и развитии семядолей [37]. Повышение уровня S-нитрозилирования белков выявлено на стадии прорастания во многих видах растений, в частности у бобов и *A. thaliana* [19, 37]. Нитрозилирование/денитрозилирование аскорбат пероксидазы (APX1) играет важную роль в NO-зависимой регуляции роста и формирования архитектуры корней [97]. Кроме того, уровень S-нитрозилирования APX при воздействии засухи коррелирует со снижением уровня образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в растительных клетках [14]. Показано, что при S-нитрозилировании происходит активация регуляторного белка, вовлекаемого в регуля-

цию функционирования мембранных K<sup>+</sup>-каналов в замыкающих клетках устьиц, что способствует закрытию устьиц при засухе. Эти данные указывают на то, что процесс S-нитрозилирования играет свою роль при регуляции устьичных движений, вносящей важный вклад в поддержание водного режима растений в условиях обезвоживания [14, 29].

Как было сказано выше, NO-индуцированные посттрансляционные модификации белков осуществляются путем нитрозилирования с участием пероксинитрита или в ходе реакций транс-нитрозилирования [20, 95]. При этом одним из главных источников NO в процессе транс-нитрозилирования выступает S-нитрозоглутатион (GSNO), принадлежащий к разряду S-нитрозотиолов, который образуется при взаимодействии NO с глутатионом. Еще одной группой соединений, участвующих в реализации NO-сигналинга являются нитро-жирные кислоты (NO<sub>2</sub>-FA — Nitro-fatty acids), образуемые при взаимодействии ненасыщенных жирных кислот с оксидом азота или его активными производными [29, 30]. Методом конфокальной микроскопии с использованием DAF-FM флуоресцентных проб было выявлено повышение уровня эндогенного NO в корнях и листьях 30-суточных растений и в суспензионной культуре клеток *A. thaliana*, инкубированных в присутствии нитро-лениловой кислоты NO<sub>2</sub>-Ln [98]. Наличие NO<sub>2</sub>-FA выявлено также в растениях гороха (*Pisum sativum*) и риса (*Oryza sativa*) [99]. В экспериментах *in vitro* сочетанием методов хемилюминисценции, ЭПР и спектрофотометрии были получены данные, указывающие на высвобождение NO из NO<sub>2</sub>-Ln, что может указывать на ее функционирование в качестве донора этой сигнальной молекулы [98]. На основании выявленных различий в содержании NO<sub>2</sub>-Ln у *A. thaliana* на разных этапах развития, включая эмбриогенез, вегетативный рост и репродуктивную фазу, был сделан вывод о функционировании нитро-жирных кислот в NO-опосредованной регуляции растительного онтогенеза [99]. Кроме того, нитро-жирные кислоты могут вовлекаться в ответные реакции растений на неблагоприятные внешние факторы, на что указывают данные о повышении уровня NO<sub>2</sub>-Ln в растениях *A. thaliana* при воздействии механического стресса, засоления, неблагоприятных температур, ионов тяжелых металлов [98, 99].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История изучения оксида азота в растительных организмах насчитывает более четырех десятилетий и берет свое начало с работ, в которых было установлено образование нитрозил-гемоглобиновых комплексов в клубеньках бобовых культур [65], а также их способность к эмиссии



газообразного NO [1]. Открытие в 1990-х г.г. сигнальной роли NO в регуляции сердечно-сосудистой системы человека стало настоящим прорывом, и с того времени в современной биологической науке наступила новая эра – эра оксида азота. В конце 1990-х г.г. началось целенаправленное исследование активности NO в жизни растений. В тот же период было создано научное сообщество “Nitric Oxide Biology and Chemistry”, которое совместно с одним из крупнейших мировых издательств “Elsevier” в 1997 г. учредило выход журнала “Nitric Oxide”, периодически выпускаемый и в настоящее время. Результаты исследований по изучению свойств, метаболизма и функционирования NO в биологических объектах широко публикуются во всем мире и в других научных изданиях. Такой большой интерес к этой маленькой молекуле не является случайным, поскольку NO способен управлять жизнедеятельностью всех организмов, оказывая влияние на многочисленные обменные процессы, как на внутриклеточном, так и межклеточном уровнях. В растениях он необходим для регулирования метаболической активности в ходе всего онтогенеза, включая прорастание, вегетативный рост, корнеобразование, цветение и созревание. Оказывая влияние на процессы роста и формирования корней, оксид азота вносит весомый вклад в установление симбиотических связей и улучшение минерального питания растений. Кроме того, ему принадлежит важная роль в развитии устойчивости растений к широкому спектру неблагоприятных воздействий биотического и абиотического происхождения, среди которых наиболее распространенным является водный стресс, существенно ограничивающим рост и продуктивность культурных растений. В условиях дефицита влаги NO вовлекается в регуляцию устьичных движений, активацию осмопротекторной и антиоксидантной систем, способствуя тем самым нормализации водного режима растений, поддержанию в них фотосинтетической активности и снижению уровня окислительных повреждений, что в целом отражается в повышении жизнеспособности и продуктивности растительных культур. Именно по этой причине широко обсуждаются разные методы применения NO в растениеводстве, например, его использование в виде газа, доноров NO или NO-высвобождающих наночастиц. Вместе с тем успешное практическое применение оксида азота предполагает детальное изучение молекулярных механизмов его физиологического действия. Их глубокое понимание будет способствовать разработке эффективных стратегий применения NO на практике с целью повышения устойчивости культурных растений и максимальной реализации их потенциальной продуктивности.

Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-24-00196.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Klepper L.* Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) emissions from herbicide-treated soybean plants // *Atmos. Environ.* 1979. V. 13. P. 537. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(79\)90148-3](https://doi.org/10.1016/0004-6981(79)90148-3)
2. *Koshland D.E., Jr.* The molecule of the year // *Science.* 1992. V. 258. P. 1861. <https://doi.org/10.1126/science.1470903>
3. *Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В.* Физиологическая роль оксида азота (NO) у растительных организмов // *Журнал стресс-физиологии и биохимии.* 2009. Т. 5. С. 33.
4. *Аллагулова Ч.Р., Авальбаев А.М., Лубянова А.Р., Ласточкина О.В., Шакирова Ф.М.* Современные представления о механизмах образования оксида азота в растениях // *Физиология растений.* 2022. Т. 69. С. 339. <https://doi.org/10.31857/S0015330322030034>
5. *Красиленко Ю.А., Емец А.И., Блюм Я.Б.* Функциональная роль оксида азота у растений // *Физиология растений.* 2010. Т. 57. С. 483.
6. *Begara-Morales J.C., Chaki M., Valderrama R., Sánchez-Calvo B., Mata-Pérez C., Padilla M.N., Corpas F.J., Barroso J.B.* Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 3425. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery072>
7. *Verma N., Tiwari S., Singh V.P., Prasad S.M.* Nitric oxide in plants: an ancient molecule with new tasks // *Plant Growth Regul.* 2020. V. 90. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00543-w>
8. *Kolbert Z., Barroso J.B., Brouquisse R., Corpas F.J., Gupta K.J., Lindermayr C., Loake G.J., Palma J.M., Petrivalský M., Wendehenne D., Hancock J.T.* A forty year journey: The generation and roles of NO in plants // *Nitric Oxide.* 2019. V. 93. P. 53. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.006>
9. *Hancock J.T., Neill S.J.* Nitric Oxide: Its generation and interactions with other reactive signaling compounds // *Plants.* 2019. V. 8. P. 41. <https://doi.org/10.3390/plants8020041>
10. *León J., Costa-Broseta Á.* Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants // *Plant Cell Environ.* 2020. V. 43. P. 1. <https://doi.org/10.1111/pce.13617>
11. *Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B.* Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress // *Plant Sci.* 2011. V. 181. P. 604. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.005>
12. *Gupta K.J., Hancock J.T., Petrivalsky M., Kolbert Z., Lindermayr C., Durner J., Barroso J.B., Palma J.M., Brouquisse R., Wendehenne D., Corpas F.J., Loake G.J.* Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research // *New*

- Phytol. 2020. V. 225. P. 1828.  
<https://doi.org/10.1111/nph.16157>
13. Кудоярова Г.П., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 155.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330313020140>
  14. Santisree P., Bhatnagar-Mathur P., Sharma K.K. NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: do we have all the answers? // Plant Sci. 2015. V. 239. P. 44.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.07.012>
  15. Santisree P., Sanivarapu H., Gundavarapu S., Sharma K.K., Bhatnagar-Mathur P. Nitric oxide as a signal in inducing secondary metabolites during plant stress // Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry / Eds. J.M. Merillon, K.G. Ramawat. Springer. 2019. P. 1.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-76887-8\\_61-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76887-8_61-1)
  16. Lau S.E., Hamdan M.F., Pua T.L., Saidi N.B., Tan B.C. Plant nitric oxide signaling under drought stress // Plants. 2021. V. 10. P. 360.  
<https://doi.org/10.3390/plants10020360>
  17. Nabi R.B.S., Tayade R., Hussain A., Kulkarni K.P., Imran Q.M., Mun B.G., Yun B.W. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress // Environ. Exp. Bot. 2019. V. 161. P. 120.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>
  18. Sun C., Zhang Y., Liu L., Liu X., Li B., Jin C., Lin X. Molecular functions of nitric oxide and its potential applications in horticultural crops // Horticulture Res. 2021. V. 8. P. 71.  
<https://doi.org/10.1038/s41438-021-00500-7>
  19. Seabra A.B., Silveira N.M., Ribeiro R.V., Pieretti J.C., Barroso J.B., Corpas F.J., Palma J.M., Hancock J.T., Petřivalský M., Gupta K.J., Wendehenne D., Loake G.J., Durner J., Lindermayr C., Molnár Á. et al. Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture // New Phytol. 2022. V. 234. P. 1119.  
<https://doi.org/10.1111/nph.18073>
  20. Мамаева А.С., Фоменков А.А., Носов А.В., Мошков И.Е., Мур Л.А.Д., Холл М.А., Новоикова Г.В. Регуляторная роль оксида азота у растений // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 459.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330315040132>
  21. Hancock J.T. Nitric oxide signaling in plants // Plants. 2020. V. 9. P. 1550.  
<https://doi.org/10.3390/plants9111550>
  22. Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. On the origins of nitric oxide // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 160.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.11.007>
  23. Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Wong G.K., Wendehenne D. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom // Sci. Signaling. 2016. 9:re2.  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>
  24. Tejada-Jimenez M., Llamas A., Galván A., Fernández E. Role of nitrate reductase in NO production in photosynthetic eukaryotes // Plants. 2019. V. 8. P. 56.  
<https://doi.org/10.3390/plants8030056>
  25. Mohn M.A., Thaqi B., Fischer-Schrader K. Isoform-specific NO synthesis by *Arabidopsis thaliana* nitrate reductase // Plants. 2019. V. 8. P. 67.  
<https://doi.org/10.3390/plants8030067>
  26. Maia L.B., Moura J.J.G. Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases // J. Biol. Inorg. Chem. 2015. V. 20. P. 403.  
<https://doi.org/10.1007/s00775-014-1234-2>
  27. Costa-Broseta Á., Castillo M.C., León J. Post-translational modifications of nitrate reductases autoregulates nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 549.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22020549>
  28. Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Llamas Á., Ocaña-Calahorra F., Mariscal V., Carreras A., Barroso J.B., Galván A., Fernández E. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas* // Plant Cell Environ. 2016. V. 39. P. 2097.  
<https://doi.org/10.1111/pce.12739>
  29. Begara-Morales J.C., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., Padilla-Serrano M.N., Barroso J.B. Nitric oxide under abiotic stress conditions // Plant Life Under Changing Environment / Eds. D.K. Tripathi et al. Elsevier. 2020. P. 735.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818204-8.00032-1>
  30. Mata-Pérez C., Sánchez-Calvo B., Begara-Morales J.C., Carreras A., Padilla M.N., Melguizo M., Valderrama R., Corpas F.J., Barroso J.B. Nitro-linolenic acid is a nitric oxide donor // Nitric Oxide. 2016a. V. 57. P. 57.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.05.003>
  31. Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis // Trends Plant Sci. 2017. V. 22. P. 163.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>
  32. Foresi N., Correa-Aragunde N., Lamattina L. Synthesis, actions, and perspectives of nitric oxide in photosynthetic organisms // Nitric Oxide / Eds. L.J. Ignarro, B.A. Freeman. Elsevier. 2017. P. 125.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804273-1.00010-7>
  33. Guo F.Q., Okamoto M., Crawford N.M. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling // Sci. 2003. V. 302. P. 100.  
<https://doi.org/10.1126/science.108677>
  34. Lozano-Juste J., León J. Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia1nia2noa1-2* triple mutant impaired in NIA/NR-and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2010. V. 152. P. 891.  
<https://doi.org/10.1104/pp.109.148023>
  35. Hu W.-J., Chen J., Liu T.-W., Liu X., Chen J., Wu F.-H., Wang W.-H., He J.-X., Xiao Q., Zheng H.-L. Comparative proteomic analysis on wild type and nitric oxide-overproducing mutant (*nox1*) of *Arabidopsis thaliana* // Nitric Oxide. 2014. V. 36. P. 19.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.10.008>
  36. Yun B.-W., Feechan A., Yin M., Saidi N.B.B., Le Bihan T., Yu M., Moore J.W., Kang J.-G., Kwon E., Spoel S.H., Pallas J.A., Loake G.J. S-nitrosylation of NADPH-ox-

- idase regulates cell death in plant immunity // *Nature*. 2011. V. 478. P. 264.  
<https://doi.org/10.1038/nature10427>
37. Wang P., Zhu J.K., Lang Z. Nitric oxide suppresses the inhibitory effect of abscisic acid on seed germination by S-nitrosylation of SnRK2 proteins // *Plant Signal. Behav.* 2015. V. 10. P. 2.  
<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1031939>
  38. Shi H., Ye T., Zhu J.K., Chan Z. Constitutive production of nitric oxide leads to enhanced drought stress resistance and extensive transcriptional reprogramming in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 4119.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru184>
  39. Foresi N., Mayta M.L., Lodeyro A.F., Scuffi D., Correa-Aragunde N., García-Mata C., Casalengué C., Carrillo N., Lamattina L. Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2015. V. 82. P. 806.  
<https://doi.org/10.1111/tbj.12852>
  40. Cai W., Liu W., Wang W.S., Fu Z.W., Han T.T., Lu Y.T. Overexpression of rat neurons nitric oxide synthase in rice enhances drought and salt tolerance // *PLoS One*. 2015. 10(6):e0131599.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131599>
  41. Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moskhov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., Harren F.J.M., Hebelstrup K., Gupta K.J. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge // *AoB Plants*. 2013. 5:pls052.  
<https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052>
  42. Del Castillo F., Nejamkin A., Cassia R., Correa-Aragunde N., Fernández B., Foresi N., Lombardo C., Ramirez L., Lamattina L. The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up loose ends // *Nitric Oxide*. 2019. V. 85. P. 17.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.013>
  43. Bethke P.C., Badger M.R., Jones R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 332.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.017822>
  44. Beligni M.V., Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants // *Planta*. 2000. V. 210. P. 215.  
<https://doi.org/10.1007/PL00008128>
  45. Масленникова Д.Р., Аллагулова Ч.Р., Федорова К.А., Плотников А.А., Авальбаев А.М., Шакирова Ф.М. Вклад цитокининов в реализацию рост-стимулирующего и протекторного действия оксида азота на растения пшеницы // *Физиология растений*. 2017. Т. 64. С. 355.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330317040091>
  46. Pandey S., Kumari A., Shree M., Kumar V., Singh P., Bharadwaj C., Loake G.J., Parida S.K., Masakapalli S.K., Gupta K.J. Nitric oxide accelerates germination via the regulation of respiration in chickpea // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 4539.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz185>
  47. Zhang H., Shen W.B., Zhang W., Xu L.L. A rapid response of beta-amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination // *Planta*. 2005. V. 220. P. 708.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1390-7>
  48. Leshem Y.Y., Haramaty E. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage // *J. Plant Physiol.* 1996. V. 148. P. 258.  
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80251-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80251-3)
  49. Gouvea C.M.C.P., Souza J.F., Magalhaes A.C.N., Martins I.S. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments // *Plant Growth Regul.* 1997. V. 21. P. 183.
  50. He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D., Cook C.W., Ahn S.M., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F.Q., Fiorani F., Jackson R.B., Crawford N.M., Pei Z.M. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition // *Sci.* 2004. V. 305. P. 1968.  
<https://doi.org/10.1126/science.1098837>
  51. Prado A.M., Porterfield D.M., Feijó J.A. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes // *Development*. 2004. V. 131. P. 2707.  
<https://doi.org/10.1242/dev.01153>
  52. Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lombardo M.C., Lamattina L. Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 279.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.038554>
  53. Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato // *Planta*. 2004. V. 218. P. 900.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-003-1172-7>
  54. Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C., Lamattina L. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 581.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj045>
  55. Lombardo M.C., Graziano M., Polacco J.C., Lamattina L. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development // *Plant Signal. Behav.* 2006. V. 1. P. 28.  
<https://doi.org/10.4161/psb.1.1.2398>
  56. Graziano M., Beligni M.V., Lamattina L. Nitric oxide improves internal iron availability in plants // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 1852.  
<https://doi.org/10.1104/pp.009076>
  57. Jin C.W., Du S.T., Shamsi I.H., Luo B.F., Lin X.Y. NO synthase-generated NO acts downstream of auxin in regulating Fe-deficiency-induced root branching that enhances Fe-deficiency tolerance in tomato plants // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3875.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/err078>
  58. García M.J., Suárez V., Romera F.J., Alcántara E., Pérez-Vicente R. A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2011. V. 49. P. 537.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.019>
  59. Ding F., Wang X.-F., Shi Q.-H., Wang M.-L., Yang F.-J., Gao Q.-H. Exogenous nitric oxide alleviated the inhibition of photosynthesis and antioxidant enzyme activities in iron-deficient Chinese cabbage (*Brassica chinensis* L.) // *Agric. Sci. China*. 2008. V. 7. P. 168.  
[https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60036-X](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60036-X)

60. Buet A., Moriconi J.I., Santa-María G.E., Simontacchi M. An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 83. P. 337.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.020>
61. Wang B.L., Tang X.Y., Cheng L.Y., Zhang A.Z., Zhang W.H., Zhang F.S., Liu J.Q., Cao Y., Allan D.L., Vance C.P., Shen J.B. Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin // *New Phytol.* 2010. V. 187. P. 1112.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03323.x>
62. Chen Z.H., Wang Y., Wang J.W., Babla M., Zhao C., García-Mata C., Sani E., Differ C., Mak M., Hills A., Amtmann A., Blatt M.R. Nitrate reductase mutation alters potassium nutrition as well as nitric oxide-mediated control of guard cell ion channels in *Arabidopsis* // *New Phytol.* 2016. V. 209. P. 1456.  
<https://doi.org/10.1111/nph.13714>
63. Xia J., Kong D., Xue S., Tian W., Li N., Bao F., Hu Y., Du J., Wang Y., Pan X., Wang L., Zhang X., Niu G., Feng X., Li L., et al. Nitric oxide negatively regulates AKT1-mediated potassium uptake through modulating vitamin B6 homeostasis in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 16196.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.141747311>
64. Gupta K.J., Kaladhar V.Ch., Fitzpatrick T.B., Fernie A.R., Møller I.M., Loake G.J. Nitric oxide regulation of plant metabolism // *Mol. Plant.* 2022. V. 15. P. 228.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.012>
65. Maskall C.S., Gibson J.F., Dart P.J. Electron-paramagnetic-resonance studies of leghaemoglobins from soybean and cowpea root nodules. Identification of nitrosyl-leghaemoglobin in crude leghaemoglobin preparations // *Biochem. J.* 1977. V. 167. P. 435.  
<https://doi.org/10.1042/bj1670435>
66. Kanayama Y., Yamamoto Y. Formation of nitrosylleghaemoglobin in nodules of nitrate-treated cowpea and pea plants // *Plant Cell Physiol.* 1991. V. 32. P. 19.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078048>
67. Mathieu C., Moreau S., Frendo P., Puppo A., Davies M.J. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide leghaemoglobin complexes // *Free Rad. Biol. Med.* 1998. V. 24. P. 1242.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00440-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00440-1)
68. Cueto M., Hernández-Perera O., Martín R., Bentura M.L., Rodrigo J., Lamas S., Golvano M.P. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus* // *FEBS Lett.* 1996. V. 398. P. 159.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01232-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01232-X)
69. Horchani F., Prévot M.A., Bosdari E., Evangelisti E., Meilhoc C., Bruand P., Raymond E., Boncompagni A.-S.S., Puppo A., Brouquisse R. Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 1023.  
<https://doi.org/10.1104/pp.110.166140>
70. Murakami E., Nagata M., Shimoda Y., Kucho K., Higashi S., Abe M., Hashimoto M., Uchiumi T. Nitric oxide production induced in roots of *Lotus japonicus* by lipopolysaccharide from *Mesorhizobium loti* // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. P. 610.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcr020>
71. Sasakura F., Uchiumi T., Shimoda Y., Suzuki A., Take-nouchi K., Higashi S., Abe M. A class I hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006. V. 19. P. 441.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0441>
72. Catalá M., Gasulla F., Pradas del Real A.E., García-Breijo F., Reig-Armiñana J., Barreno E. Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis // *BMC Microbiol.* 2010. V. 10. P. 297.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-297>
73. Espinosa F., Garrido I., Ortega A., Casimiro I., Alvarez-Tinaut M.C. Redox activities and ROS, NO and phenylpropanoids production by axenically cultured intact olive seedling roots after interaction with a mycorrhizal or a pathogenic fungus // *PLoS One.* 2014. 9:e100132.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100132>
74. Kolbert Z., Bartha B., Erdei L. Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress // *Acta Biol. Szeged.* 2005. V. 49. P. 13.
75. Montilla-Bascón G., Rubiales D., Hebelstrup K.H., Mandon J., Harren F.J.M., Cristescu S.M., Mur L.A.J., Prats E. Reduced nitric oxide levels during drought stress promote drought tolerance in barley and is associated with elevated polyamine biosynthesis // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 13311.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13458-1>
76. Planchet E., Verdu I., Delahaie J., Cukier C., Girard C., Morère-Le Paven M.C., Limami A.M. Abscisic acid-induced nitric oxide and proline accumulation in independent pathways under water-deficit stress during seedling establishment in *Medicago truncatula* // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 2161.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru088>
77. She X.P., Song X.G., He J.M. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba* // *Acta Bot. Sin.* 2004. V. 46. P. 1292.
78. Zimmer-Prados L.M., Moreira A.S.F.P., Magalhaes J.R., Franca M.G.C. Nitric oxide increases tolerance responses to moderate water deficit in leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* bean species // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2014. V. 20. P. 295.  
<https://doi.org/10.1007/s12298-014-0239-1>
79. Patakas A.A., Zotos A., Beis A.S. Production, localisation and possible roles of nitric oxide in drought-stressed grapevines // *Austr. J. Grape Wine Res.* 2010. V. 16. P. 203.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00064.x>
80. García-Mata C., Lamattina L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. P. 790.  
<https://doi.org/10.1104/pp.011020>
81. Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 165.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm293>
82. Sahay S., Torres E.D.L.C., Robledo-Arratia L., Gupta M. Photosynthetic activity and RAPD profile of polyethylene glycol treated *B. juncea* L. under nitric oxide and abscisic

- acid application // *J. Biotech.* 2020. V. 313. P. 29.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.004>
83. *Da Silva Leite R., do Nascimento M.N., Tanan T.T., Gonçalves Neto L.P., da Silva Ramos C.A., da Silva A.L.* Alleviation of water deficit in *Physalis angulata* plants by nitric oxide exogenous donor // *Agric. Water Manag.* 2019. V. 216. P. 98.  
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.02.001>
84. *Silveira N.M., Frungillo L., Marcos F.C.C., Pelegrino M.T., Miranda M.T. Seabra A.B., Salgado I., Machado E.C., Ribeiro R.V.* Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit // *Planta.* 2016. V. 244. P. 181.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-016-2501-y>
85. *Jasid S., Simontacchi M., Bartoli C.G., Puntarulo S.* Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 1246.  
<https://doi.org/10.1104/pp.106.086918>
86. *Wang Y., Suo B., Zhao T., Qu X., Yuan L., Zhao X., Zhao H.* Effect of nitric oxide treatment on antioxidant responses and *psbA* gene expression in two wheat cultivars during grain filling stage under drought stress and rewatering // *Acta Physiol. Plant.* 2011. V. 33. P. 1923.
87. *Колупнаев Ю.Е., Кокорев А.И.* Антиоксидантная система и устойчивость растений к недостатку влаги // *Физиология растений и генетика.* 2019. Т. 51. С. 28.  
<https://doi.org/10.15407/frg2019.01.028>
88. *Rezayian M., Ebrahimzadeh H., Niknam V.* Nitric oxide stimulates antioxidant system and osmotic adjustment in soybean under drought stress // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2020. V. 20. P. 1122.  
<https://doi.org/10.1007/s42729-020-00198-x>
89. *Farooq M., Basra M.A., Wahid A., Rehman H.* Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.) // *J. Agro. Crop Sci.* 2009. V. 195. P. 254.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2009.00367.x>
90. *Gan L., Wu X., Zhong Y.* Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in hullless barley // *Plant Prod. Sci.* 2015. V. 18. P. 52.  
<https://doi.org/10.1626/ppls.18.52>
91. *Колупнаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О.* Пролин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях // *Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер.: Біологія.* 2014. №. 2. С. 6.
92. *Zhang L., Ruan Z., Tian L., Lai J., Zheng P.E.N.G., Liang Z., Alva A.K.* Foliar-applied urea modulates nitric oxide synthesis metabolism and glycinebetaine accumulation in drought-stressed maize // *Pak. J. Bot.* 2014. V. 46. P. 1159.
93. *Zhao Y., Wei X., Long Y., Ji X.* Transcriptional analysis reveals sodium nitroprusside affects alfalfa in response to PEG-induced osmotic stress at germination stage // *Protoplasma.* 2020. V. 257. P. 1345.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-020-01508-x>
94. *Ziogas V., Tanou G., Filippou P., Diamantidis G., Vasilakakis M., Fotopoulos V., Molassiotis A.* Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. V. 68. P. 118.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.04.004>
95. *Сидоренко Е.С., Харитонашвили Е.В.* Роль NO в регуляции растительного метаболизма // *Всеросс. журн. науч. публ.* 2011. №. 8. С. 18.
96. *Kusaba M., Tanaka A., Tanaka R.* Stay-green plants: What do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence // *Photosynth. Res.* 2013. V. 117. P. 221.  
<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9862-x>
97. *Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., Lamattina L.* Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 3339.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert172>
98. *Mata-Pérez C., Sánchez-Calvo B., Padilla M.N., Begara-Morales J.C., Luque F., Melguizo M., Jiménez-Ruiz J., Fierro-Risco J., Peñas-Sanjuán A., Valderrama R., Corpas F.J., Barroso J.B.* Nitro-fatty acids in plant signaling: nitro-linolenic acid induces the molecular chaperone network in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2016b. V. 170. P. 686.  
<https://doi.org/10.1104/pp.15.01671>
99. *Aranda-Caño L., Sánchez-Calvo B., Begara-Morales J.C., Chaki M., Mata-Pérez C., Padilla M.N., Valderrama R., Barroso J.B.* Post-translational modification of proteins mediated by nitro-fatty acids in plants: nitroalkylation // *Plants.* 2019. V. 8. P. 82.  
<https://doi.org/10.3390/plants8040082>

УДК 581.1

## УЧАСТИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ И ИХ ОКСИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

© 2023 г. Ю. В. Венжик<sup>а</sup>, \*, А. Н. Дерябин<sup>а</sup>

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

\*e-mail: jul.venzhik@gmail.com

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 21.06.2022 г.

Принята к публикации 25.06.2022 г.

В обзоре представлен сравнительный анализ данных об участии наиболее используемых в физиологии растений наночастиц металлов и их оксидов в регуляции про-/антиоксидантного баланса у высших растений. Показана двойственная роль наночастиц, которые, с одной стороны, выступают в качестве триггеров окислительного стресса, а с другой, способны противодействовать его развитию и повышать эффективность антиоксидантной системы растений. В условиях действия абиотического стресса наночастицы могут действовать как адаптогены, усиливая антиоксидантную защиту растений. Обсуждаются возможные механизмы действия наночастиц, а также перспективы их использования в фундаментальной науке и сельском хозяйстве.

**Ключевые слова:** высшие растения, про-/антиоксидантный баланс, наночастицы металлов, устойчивость к абиотическим стрессам

**DOI:** 10.31857/S0015330322600371, **EDN:** CYIMAC

### ВВЕДЕНИЕ

В течение жизненного цикла растения сталкиваются с различными абиотическими стресс-факторами (засуха, засоление, действие низких и высоких температур, тяжелых металлов и др.), которые ограничивают их географическое распространение и снижают урожайность. В условиях глобального изменения климата и возрастающей антропогенной нагрузки создается дополнительное давление на биоценозы, а растения вследствие прикреплённого образа жизни являются наиболее уязвимыми их компонентами. В ходе эволюции растения сформировали ряд защитных систем, обеспечивающих их стрессоустойчивость. Одна из них представлена многокомпонентной антиоксидантной системой (АОС), которая выполняет функцию универсального щита от окислительного стресса — неотъемлемой составляющей любого абиотического воздействия [1, 2]. Для фотосинтезирующих организмов эффективно функционирующая АОС особенно важна, поскольку именно хлоропласты являются одними из основных источников активных форм кислорода (АФК) — взаимно превращающихся реакционноспособных форм кислорода, таких как, супероксидный анион-ра-

дикал ( $O_2^-$ ), гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) и др. [3–5]. Если в оптимальных условиях генерация АФК представляет собой неотъемлемую часть жизненного процесса растительного организма, то под влиянием абиотических стресс-факторов их уровень в клетках может резко возрасти и вызвать развитие окислительного стресса, следствием которого являются интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ), повреждения органелл, мембран, структуры нуклеиновых кислот, денатурация белков и др. [5, 6]. Поэтому изучение механизмов регуляции работы АОС, возможностей ее дополнительного стимулирования, а также поддержания стрессоустойчивости растений в постоянно меняющихся условиях внешней среды являются актуальной биологической проблемой.

Мощное развитие нанотехнологий привело к появлению в жизни людей большого количества разнообразных наноматериалов. С одной стороны, малые размеры (до 100 нм), высокая реакционная способность, уникальные физико-химические, оптические и электрические свойства [7, 8] предполагают определенные риски от взаимодействия наночастиц (НЧ) с живыми организмами. С другой стороны, материалы на основе НЧ уже широко используются в сельском хозяйстве в качестве

**Сокращения:** АОС — антиоксидантная система, НЧ — наночастицы.

наноудобрений, регуляторов роста и развития растений, а также веществ с пестицидной и гербицидной активностью [7, 9]. В связи с этим, перспективы дальнейшего внедрения наноматериалов в биологические науки и сельское хозяйство представляют особый интерес.

Известно, что НЧ металлов и их оксидов способны влиять на различные аспекты жизнедеятельности растительного организма на всех уровнях его организации. Проникая внутрь растений, НЧ изменяют их метаболизм, усиливают или угнетают ростовые процессы, фотосинтез, водный обмен, АОС, влияют на ультраструктуру клеток и экспрессию генов [7, 8, 10–12]. Представляется актуальным проведение комплексных исследований, которые бы не только отражали основные эффекты НЧ на растительные организмы, но и раскрывали их роль в стрессовом ответе растений на действие различных абиотических факторов. Вопросы о вкладе НЧ в развитие окислительного стресса и влияния их на АОС, как основную неспецифическую систему защиты растений, до сих пор не совсем ясны, поскольку имеющиеся в современной литературе многочисленные экспериментальные данные часто противоречивы. Целью данного аналитического обзора является систематизация данных последних лет об участии наиболее используемых НЧ металлов и их оксидов в регуляции про-/антиоксидантного баланса у высших растений.

### ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ И ИХ ОКСИДОВ НА ПРО-/АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС РАСТЕНИЙ

Поступление и распределение НЧ в клетках и тканях растений, а также эффекты НЧ на растительный организм, как известно, зависят от целого ряда факторов: типа, размеров, дзета-потенциала НЧ, их дозы (концентрации коллоидного раствора), вида растения, способа обработки и др. [13, 14]. Мы проанализировали данные о влиянии НЧ на про-/антиоксидантный баланс высших растений, учитывая тип НЧ, концентрационный эффект и специфику объекта (табл. 1). Анализ показал, что наиболее часто в экспериментальных исследованиях с растениями используются НЧ серебра (НЧ Ag), золота (НЧ Au), а также оксидов церия (НЧ CeO<sub>2</sub>), меди (НЧ CuO), железа (НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), титана (НЧ TiO<sub>2</sub>) и цинка (НЧ ZnO). Большинство исследователей отмечают, что практически все эти НЧ вызывали окислительный стресс, стимулируя генерацию и накопление АФК и продуктов ПОЛ в тканях растений [15–43]. Такого рода эффекты наблюдали независимо от концентраций используемых растворов НЧ на широком ряде растительных объектов (табл. 1). Например, под влиянием НЧ TiO<sub>2</sub> увеличивалось

содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листьях горошка [38], а НЧ ZnO стимулировали накопление конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) в листьях пшеницы [43]. Отдельно следует отметить НЧ Au, которые в низких концентрациях (до 25 мг/л) вызывали обратный эффект – снижение содержания АФК и продуктов ПОЛ [22, 44, 45].

Однако НЧ металлов и их оксидов способны не только индуцировать развитие окислительного стресса, но и влиять на АОС растений [17, 19, 21, 23, 24, 27, 31, 33, 36–38, 42–55] (табл. 1). Увеличение активности антиоксидантных ферментов одновременно с усилением окислительного стресса наблюдали под влиянием НЧ Ag у растений многокоренника и картофеля [17, 19], НЧ Au – у горчицы и арбуза [23, 24], НЧ CeO<sub>2</sub> – у кукурузы [27] и т.д. (табл. 2). Снижение активности ферментов АОС наблюдалось под влиянием НЧ Ag, ZnO и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [42, 56, 57]. Можно констатировать, что все наиболее изученные НЧ металлов и их оксидов в оптимальных условиях (без действия стресс-фактора) вовлечены в оба процесса – вызывают окислительный стресс, с одной стороны, и повышают активность ферментов АОС, с другой (табл. 1). В ряде случаев действие НЧ на эти процессы имело прямую концентрационную зависимость. Например, НЧ CuO в низкой концентрации (10–50 мг/л) стимулировали активность ферментов АОС, а в высокой концентрации (100–1000 мг/л) приводили к развитию окислительного стресса у риса [36]. Сходные эффекты обнаружены под влиянием НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> у ослинника [37].

Следует отметить, что некоторые НЧ металлов и их оксидов стимулировали накопление в тканях растений низкомолекулярных антиоксидантов (табл. 1). Так, обработка НЧ Ag приводила к существенному увеличению содержания пролина у пшеницы [21] и глутатиона у многокоренника [17] на фоне усиленного накопления АФК в листьях в обоих случаях.

В литературе имеются сведения о влиянии НЧ металлов и их оксидов на уровень экспрессии генов, кодирующих различные компоненты АОС (табл. 1). Например, НЧ Ag увеличивали уровень транскриптов генов, участвующих в синтезе супероксиддисмутазы, каталазы и аскорбатпероксидазы у *Arabidopsis thaliana* и риса [18, 58], а НЧ CeO<sub>2</sub> изменяли экспрессию генов, кодирующих глутатионсинтетазу [28]. Схожие эффекты обнаружены под влиянием НЧ Au [45] и Ti [59].

Проведенный анализ убедительно демонстрирует, что в оптимальных условиях НЧ металлов и их оксидов, преимущественно стимулировали накопление АФК и продуктов ПОЛ, усиливая окислительные процессы в тканях растений, но при этом повышали активность АОС, влияя как

**Таблица 1.** Участие наночастиц металлов и их оксидов в регуляции про-/антиоксидантного баланса у растений

| Тип наночастиц                          | Доза*               | Объект                         | Ссылка |
|---|---------------------|--------------------------------|--------|
| Накопление АФК, усиление ПОЛ            |                     |                                |        |
| Ag                                      | 20–80 мг/л          | <i>Allium cepa</i>             | [15]   |
|   | 1–10 мг/л           | <i>Lemna gibba</i>             | [16]   |
|   | 1–10 мг/л           | <i>Spirodela polyrhiza</i>     | [17]   |
|   | 0.5–1 мг/л          | <i>Oryza sativa</i>            | [18]   |
|   | 2–20 мг/л           | <i>Solanum tuberosum</i>       | [19]   |
|   | 500–3000 мг/л       | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [20]   |
| Au                                      | 10 мМ               | <i>Triticum aestivum</i>       | [21]   |
|   | 50–100 мг/л         | <i>Brassica juncea</i>         | [22]   |
|   | 300–400 мг/л        | <i>Brassica juncea</i>         | [23]   |
|   | 50–200 мг/л         | <i>Citrullus lanatus</i>       | [24]   |
|   | 10 мг/л             | <i>Allium cepa</i>             | [25]   |
| CeO <sub>2</sub>                        | 500–1000 мг/л       | <i>Oryza sativa</i>            | [26]   |
|   | 400 и 800 мг/кг     | <i>Zea mays</i>                | [27]   |
|   | 1000 мг/л           | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [28]   |
| CuO                                     | 500 мг/л            | <i>Oryza sativa</i>            | [29]   |
|   | 10 и 100 мг/л       | <i>Brassica rapa</i>           | [30]   |
|   | 0.025–5 мг/л        | <i>Elodea densa</i>            | [31]   |
|   | 500 мг/кг           | <i>Triticum aestivum</i>       | [32]   |
|   | 0.5–1.5 ммоль       | <i>Oryza sativa</i>            | [33]   |
|   | 5–20 мг/л           | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [34]   |
|   | 20–500 мг/л         | <i>Vigna radiata</i>           | [35]   |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>          | 100–1000 мг/л       | <i>Oryza sativa</i>            | [36]   |
|   | 1 г/л               | <i>Oenothera biennis</i>       | [37]   |
| TiO <sub>2</sub>                        | 2–4%                | <i>Vicia narbonensis</i>       | [38]   |
| ZnO                                     | 100, 500, 1000 мг/л | <i>Cucumis sativus</i>         | [32]   |
|   | 500 мг/кг           | <i>Pisum sativum</i>           | [39]   |
|   | 1600–3200 мг/кг     | <i>Zea mays</i>                | [40]   |
|   | 25–100 мг/кг        | <i>Triticum aestivum</i>       | [41]   |
|   | 1000 мг/кг          | <i>Solanum lycopersicum</i>    | [42]   |
|   | 100–300 мкмоль      | <i>Triticum aestivum</i>       | [43]   |
| Снижение содержания АФК и продуктов ПОЛ |                     |                                |        |
| Au                                      | 25 мг/л             | <i>Brassica juncea</i>         | [22]   |
|   | 5 мг/л              | <i>Phaseolus vulgaris</i>      | [44]   |
|   | 10 мг/л             | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [45]   |
| Усиление активности ферментов АОС       |                     |                                |        |
| Ag                                      | 1000 мг/л           | <i>Lycopersicon esculentum</i> | [46]   |
|   | 1–10 мг/л           | <i>Spirodela polyrhiza</i>     | [17]   |
|   | 2–10 мг/л           | <i>Solanum tuberosum</i>       | [19]   |
|   | 5 мг/л              | <i>Phaseolus vulgaris</i>      | [44]   |
|   | 10–40 мг/л          | <i>Oryza sativa</i>            | [47]   |
| Au                                      | 10 и 80 мг/л        | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [48]   |
|   | 100–400 мг/л        | <i>Brassica juncea</i>         | [23]   |
|   | 20–200 мг/л         | <i>Citrullus lanatus</i>       | [24]   |
|   | 5 мкг/мл            | <i>Phaseolus vulgaris</i>      | [44]   |



Таблица 1. Окончание

| Тип наночастиц   | Доза*                | Объект                         | Ссылка |
|--|----------------------|--------------------------------|--------|
| CeO <sub>2</sub>   | 400 и 800 мг/кг      | <i>Zea mays</i>                | [27]   |
|  | 400 мкг/мл           | <i>Triticum aestivum</i>       | [49]   |
| CuO  | 0.025–5 мг/л         | <i>Elodea densa</i>            | [31]   |
|  | 1.0 и 1.5 ммоль      | <i>Oryza sativa</i>            | [33]   |
|  | 10–50 мг/л           | <i>Oryza sativa</i>            | [36]   |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                               | 0.2 и 0.5 г/л        | <i>Oenothera biennis</i>       | [37]   |
| TiO <sub>2</sub>   | 2–4%                 | <i>Vicia narbonensis</i>       | [38]   |
|  | 10–50 мг/л           | <i>Allium cepa</i>             | [50]   |
|  | 5 мг/л               | <i>Cicer arietinum</i>         | [51]   |
| ZnO  | 100 мг/л             | <i>Zea mays</i>                | [52]   |
|  | 1, 10 и 100 мг/л     | <i>Fagopyrum esculentum</i>    | [53]   |
|  | 25–100 мг/кг         | <i>Triticum aestivum</i>       | [42]   |
|  | 3, 6 и 9 г/л         | <i>Crocus sativus</i>          | [54]   |
|  | 25–100 мг/л          | <i>Triticum aestivum</i>       | [55]   |
|  | 100–300 мкмоль       | <i>Triticum aestivum</i>       | [43]   |
| Снижение активности ферментов АОС                            |                      |                                |        |
| Ag   | 3 мМ                 | Mustard ( <i>Brassica</i> sp.) | [56]   |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                               | 200 мг/л             | <i>Triticum aestivum</i>       | [57]   |
| ZnO  | 300, 600, 1000 мг/кг | <i>Solanum lycopersicum</i>    | [42]   |
| Накопление низкомолекулярных антиоксидантов                  |                      |                                |        |
| Ag   | 1–10 мг/л            | <i>Spirodela polyrhiza</i>     | [17]   |
|  | 10 мМ                | <i>Triticum aestivum</i>       | [21]   |
| Au   | 100–400 мг/л         | <i>Brassica juncea</i>         | [23]   |
| CuO  | 10–20 мг/л           | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [34]   |
|  | 100–500 мг/л         | <i>Vigna radiata</i>           | [35]   |
|  | 100–1000 мг/л        | <i>Oryza sativa</i>            | [36]   |
| TiO <sub>2</sub>   | 0.2–4%               | <i>Vicia narbonensis</i>       | [38]   |
| Изменение уровня транскриптов генов, кодирующих элементы АОС |                      |                                |        |
| Ag   | 0.5–3 мг/л           | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [58]   |
|  | 0.5–1 мг/л           | <i>Oryza sativa</i>            | [18]   |
| Au   | 10 мг/л              | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [45]   |
| CeO <sub>2</sub>   | 1000 мг/л            | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | [28]   |
| Ti   | 0.25%                | <i>Vigna radiata</i>           | [59]   |

Примечание. Доза – концентрация НЧ в коллоидном растворе.

на ферментативный ее компонент, так и на содержание низкомолекулярных антиоксидантов. Такое двойственное действие НЧ на про-/антиоксидантный баланс растений значительно затрудняет представления о возможных механизмах и дальнейшем использовании наноматериалов в биологии. В связи с этим большой интерес представляют данные о влиянии НЧ металлов и их оксидов на окислительные процессы и про-/антиоксидантный баланс растений в условиях действия абиотических стресс-факторов.

Нами проанализированы сведения об участии НЧ металлов и их оксидов в регуляции окислительного стресса, вызванного действием на растения абиотических стресс-факторов, в частности, низких температур [51, 60, 61], засоления [62–69], засухи [55, 70–75] и тяжелых металлов [41, 76–87]. Представленные в таблице 2 данные отражают эффекты НЧ металлов и их оксидов на растения, находящиеся в условиях действия абиотического стресс-фактора по сравнению с эффектами того же стресс-фактора без обработки НЧ. Как можно

**Таблица 2.** Влияние наночастиц металлов и их оксидов на про-/антиоксидантный баланс растений в условиях действия абиотических факторов

| Тип наночастиц                 | Доза*                  | Объект                         | Эффект   | Ссылка |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|--|--------|
| Низкая температура             |                        |                                |  |        |
| TiO <sub>2</sub>               | 5 мг/л                 | <i>Cicer arietinum</i>         | Снижение содержания МДА  | [60]   |
|                                | 5 мг/л                 | <i>Cicer arietinum</i>         | Снижение содержания АФК, усиление активности ферментов АОС   | [51]   |
| ZnO                            | 20–100 мг/л            | <i>Oryza sativa</i>            | Снижение содержания МДА, АФК, усиление активности ферментов АОС, снижение уровня транскриптов генов, кодирующих ферменты АОС | [61]   |
| Засоление                      |                        |                                |  |        |
| Ag                             | 300 мг/л               | <i>Triticum aestivum</i>       | Снижение содержания МДА, АФК   | [62]   |
| Au                             | 300 мг/л               | <i>Triticum aestivum</i>       | Накопление АФК, усиление активности ферментов АОС, накопление пролина  | [62]   |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 10–30 мкмоль           | <i>Mentha piperita</i>         | Снижение содержания МДА, активности ферментов АОС  | [63]   |
|                                | 60–90 мг/л             | <i>Dracocephalum moldavica</i> | Накопление антиоксидантов, усиление активности ферментов АОС   | [64]   |
| TiO <sub>2</sub>               | 100 мг/л               | <i>Dracocephalum moldavica</i> | Снижение содержания АФК  | [65]   |
|                                | 60 мкг/мл              | <i>Zea mays</i>                | Снижение содержания МДА, усиление активности ферментов АОС   | [66]   |
| ZnO                            | 60 мг/л                | <i>Lupinus termis</i>          | Снижение содержания МДА, усиление активности ферментов АОС   | [67]   |
|                                | 10 мг/л                | <i>Abelmoschus esculentus</i>  | Усиление активности ферментов АОС  | [68]   |
|                                | 10–100 мг/л            | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Усиление активности ферментов АОС  | [69]   |
| Засуха                         |                        |                                |  |        |
| CeO <sub>2</sub>               | 10 мг/л                | <i>Sorghum bicolor</i>         | Снижение содержания МДА, АФК   | [70]   |
| Cu                             | 52, 69.4 и 86.8 мкмоль | <i>Zea mays</i>                | Снижение содержания АФК, усиление активности ферментов АОС   | [71]   |
|                                | 5–40 мкмоль            | <i>Melissa officinalis</i>     | Снижение содержания МДА, АФК, активности ферментов АОС   | [72]   |
| TiO <sub>2</sub>               | 0.5–1 мг/мл            | <i>Brassica napus</i>          | Снижение содержания МДА  | [73]   |
|                                | 10–500 мг/л            | <i>Linum usitatissimum</i>     | Снижение содержания МДА, АФК   | [74]   |
| ZnO                            | 100 мг/л               | <i>Zea mays</i>                | Повышение содержания МДА, АФК, усиление экспрессии генов, кодирующих ферменты АОС  | [75]   |
|                                | 25–100 мг/л            | <i>Triticum aestivum</i>       | Снижение содержания МДА, АФК, усиление активности ферментов АОС  | [55]   |
| Тяжелые металлы                |                        |                                |  |        |
| Au                             | 100 мг/л               | <i>Oryza sativa</i>            | Снижение содержания МДА, АФК, усиление активности ферментов АОС  | [76]   |
|                                | 200 мкмоль             | <i>Oryza sativa</i>            | Снижение содержания МДА, усиление активности ферментов АОС   | [77]   |
| Fe                             | 1 и 2%                 | <i>Helianthus annuus</i>       | Усиление активности ферментов АОС  | [78]   |
|                                | 25–50 мг/л             | <i>Oryza sativa</i>            | Снижение содержания МДА, усиление активности ферментов АОС   | [79]   |
| FeO                            | 100 мг/кг              | <i>Triticum aestivum</i>       | Снижение содержания МДА, АФК, активности ферментов АОС   | [80]   |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 50 и 100 мг/кг         | <i>Oryza sativa</i>            | Снижение содержания МДА, АФК, усиление активности ферментов АОС  | [81]   |

Таблица 2. Окончание

| Тип наночастиц                 | Доза*           | Объект                       | Эффект   | Ссылка |
|--------------------------------|-----------------|------------------------------|--|--------|
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | 2.0 г/л         | <i>Triticum aestivum</i>     | Снижение содержания МДА, усиление активности ферментов АОС   | [82]   |
| TiO <sub>2</sub>               | 100–300 мг/кг   | <i>Glycine max</i>           | Повышение содержания МДА   | [83]   |
|                                | 10, 15, 20 мг/л | <i>Oryza sativa</i>          | Снижение содержания МДА, усиление активности ферментов АОС   | [84]   |
| ZnO                            | 25 мг/л         | <i>Leucaena leucocephala</i> | Снижение содержания МДА, усиление активности ферментов АОС   | [85]   |
|                                | 25–100 мг/кг    | <i>Triticum aestivum</i>     | Усиление активности ферментов АОС  | [41]   |
|                                | 25–100 мг/л     | <i>Triticum aestivum</i>     | Усиление активности ферментов АОС  | [86]   |
|                                | 100 мг/л        | <i>Glycine max</i>           | Повышение содержания МДА, АФК  | [81]   |
|                                | 25–50 мг/л      | <i>Glycine max</i>           | Повышение содержания МДА, АФК, накопление низкомолекулярных антиоксидантов и изменение уровня экспрессии кодирующих их генов | [87]   |

Примечание. Доза – концентрация НЧ в коллоидном растворе.

видеть, растения, обработанные НЧ, отличались более высокой стрессоустойчивостью к действующим на них абиотическим факторам, чем контрольные (необработанные НЧ) растения. Наблюдаемое увеличение стрессоустойчивости растений в большинстве случаев было сопряжено с предотвращением развития окислительного стресса и усилением антиоксидантной защиты (табл. 2). Так, у растений нута, обработанных НЧ TiO<sub>2</sub> и подвергнутых последующему охлаждению, активность каталазы, аскорбатпероксидазы и гваяколпероксидазы усиливалась, а содержание МДА и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листьях снижалось по сравнению с необработанными растениями в тех же условиях [51]. У проростков риса, обработанных НЧ ZnO, при действии низких температур наблюдали снижение содержания МДА и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в тканях на фоне усиления активности супероксиддисмутазы и каталазы и изменения уровня транскриптов генов, кодирующих их [61]. В условиях засоления под влиянием НЧ Au отмечено снижение скорости генерации АФК наряду с увеличением активности ферментов АОС и накоплением пролина в листьях пшеницы [62]. Корневая обработка растений риса нанокмпозиатами, содержащими НЧ Au, снижала токсический эффект кадмия, препятствуя его абсорбции клетками корней и нивелируя риски развития окислительного стресса [76, 77]. Обработка растений подсолнечника, сои, риса и пшеницы НЧ Fe, Ti, Zn и их оксидов приводила к снижению окислительного стресса, вызванного действием тяжелых металлов [78–86].

Приведенные данные позволяют предполагать возможность использования различных НЧ металлов и их оксидов в качестве адаптогенов, уси-

ливающих устойчивость растений к абиотическим стрессовым факторам, действие которых, как правило, сопровождается повышенной генерацией АФК и, как следствие, развитием окислительного стресса. Механизмы действия НЧ на растения активно обсуждаются, однако в значительной степени они носят гипотетический характер.

#### МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ И ИХ ОКСИДОВ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В РАСТЕНИЯХ

Представления о возможных механизмах влияния НЧ металлов и их оксидов на развитие и регуляцию окислительного стресса у растений в обобщенном виде представлены на рис. 1. Установлено, что в оптимальных условиях НЧ способны, с одной стороны, вызывать развитие окислительного стресса, а с другой, регулировать его за счет влияния на компоненты АОС. Рассмотрим отдельные аспекты этих процессов.

Прежде всего, усиление генерации АФК и последующее развитие окислительного стресса под влиянием НЧ металлов и их оксидов – это типичная ответная реакция растительного организма на поступление в него чужеродного химического вещества [88, 89]. Ионы металлов могут высвобождаться из состава НЧ и непосредственно повреждать клетки и их структурные компоненты и усиливать образование АФК. Кроме того, НЧ могут вступать в контакт с биомолекулами, например, белками и липидами, формируя новые по своей природе биохимические комплексы с высокой химической активностью [88, 89]. Внутри



**Рис. 1.** Механизмы влияния наночастиц металлов и их оксидов на развитие и регуляцию окислительного стресса у растений.

этих комплексов возможно образование относительно стабильных свободных радикальных интермедиатов, участвующих в иницировании АФК. Именно высокая химическая активность НЧ обуславливает усиление генерации АФК, включая такие высокореакционные формы как  $O_2^-$  и  $\cdot OH$ , которые напрямую или посредством активации ферментативных процессов индуцируют развитие окислительного стресса в клетках растений [88, 90].

Кроме того, в литературе активно обсуждается способность НЧ металлов и их оксидов запускать классические стрессовые сигнальные реакции, например,  $Ca^{2+}$  – ассоциированный сигнальный путь. Так, НЧ Ag повышали концентрацию  $Ca^{2+}$  в цитозоле [20], а также связывались непосредственно с  $Ca^{2+}$ -связывающими белками, усиливая АФК-сигналинг [90], а НЧ Co и Fe влияли на уровень транскриптов генов, кодирующих  $Ca^{2+}$ -связывающие белки [90]. Есть сведения, что некоторые НЧ индуцировали синтез стрессовой сигнальной молекулы NO [91, 92], запускающей каскад защитных реакций в организме [93]. Предполагают, что НЧ могут “мимикрировать” под сигнальные молекулы, связываясь с белками и запуская различные процессы в клетках, в том числе, генерацию АФК [90].

Следует отметить, что сигнальные функции АФК и продуктов ПОЛ очень важны и реализуются

через регуляцию кальциевого статуса, гормональную сигнализацию и сигнализацию с участием редокс-сигнальных систем, а также факторов транскрипции и регуляторов экспрессии некоторых хлоропластных и ядерных генов [4]. Именно АФК выступают в качестве своеобразного “счетчика” стрессовой нагрузки и в определенный момент “запускают” работу АОС [3, 4]. Поэтому НЧ металлов и их оксидов, выступая в качестве триггеров окислительного стресса, одновременно усиливают антиоксидантную защиту растений (рис. 1).

Характер влияния НЧ металлов и их оксидов на развитие и регуляцию окислительного стресса в оптимальных условиях и при действии абиотических стресс-факторов отражен в таблице 3. Если в оптимальных условиях НЧ, за небольшим исключением, усиливали окислительный стресс, то в условиях действия абиотических стресс-факторов – снижали его риски. При этом как в оптимальных, так и в неблагоприятных (стрессовых) условиях НЧ металлов и их оксидов стимулировали активность АОС (табл. 3). Следует отдельно подчеркнуть, что таблица 3 является схематической, и отмеченные стрелками эффекты проявляются во всегда, однако достаточно часто отмечаются во многих работах. Еще раз отметим, что эффекты НЧ зависят от целого ряда параметров, включая как тип, размер, концентрацию коллоидного раствора НЧ, так и особенности объектов и условий постановки опыта.

**Таблица 3.** Характер влияния наночастиц металлов и их оксидов на регуляцию про-/антиоксидантного баланса в оптимальных условиях и при действии абиотических стрессов

| Тип наночастиц   | Оптимальные условия |                          |                                 | Абиотические стрессы |                          |                                 |
|--|---------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------------|
|  | накопление АФК      | активность ферментов АОС | неферментативные компоненты АОС | накопление АФК       | активность ферментов АОС | неферментативные компоненты АОС |
| Ag   | ↑                   | ↑↓                       | ↑                               | ↑↓                   | —                        | —                               |
| Au   | ↑↓                  | ↓                        | ↑                               | ↑                    | ↑                        | ↑                               |
| CeO <sub>2</sub>   | ↑                   | ↓                        | —                               | ↑                    | ↑                        | —                               |
| Cu, CuO  | ↑                   | ↓                        | ↑                               | ↑                    | ↑                        | —                               |
| Fe, FeO, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | ↑                   | ↑↓                       | —                               | ↑                    | ↑                        | —                               |
| Ti, TiO <sub>2</sub>   | ↑                   | ↑↓                       | ↑                               | ↑                    | ↑                        | —                               |
| ZnO  | ↑                   | ↓                        | —                               | ↑↓                   | ↑                        | ↑                               |

Примечание. Эффекты наночастиц: ↑ – стимулирующий, ↓ – подавляющий, “—” – не наблюдали.

Логично возникает вопрос – за счет чего НЧ в условиях действия абиотических стресс-факторов способны снижать риски развития окислительного стресса и увеличивать стрессоустойчивость растений? Только ли посредством сигнальных функций АФК и продуктов ПОЛ осуществляется регуляция АОС растений под влиянием НЧ в условиях действия стрессоров?

Для многих НЧ металлов и их оксидов характерно явление поверхностного плазмонного резонанса [94]. Суть эффекта заключается в том, что благодаря высокому отношению площади поверхности частицы к ее объему активность электронов в составе НЧ многократно увеличивается под влиянием света определенной длины волны [94]. Именно с этим эффектом связывают способность НЧ регулировать интенсивность процесса фотосинтеза – основного источника АФК. Так, высказана гипотеза о способности НЧ “улавливать” фотоны света и облегчать передачу энергии в свето-собирающем комплексе (ССК) [95]. При этом в присутствии НЧ отмечают усиление скорости электронного транспорта, реакции Хилла, изменение параметров флуоресценции хлорофилла [95].

С эффектом поверхностного плазмонного резонанса, видимо, связаны каталитические свойства НЧ [14, 96]. Впервые этот термин был применен в 2004 г. для нанокластеров золота со свойствами рибонуклеазы [97]. В качестве первого “наноэнзима” с антиоксидантной активностью описаны НЧ CeO<sub>2</sub>, способные обезвреживать O<sub>2</sub><sup>-</sup> за счет быстрого перехода между Ce<sup>3+</sup> и Ce<sup>4+</sup> в со-

ставе НЧ, а также разлагать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [98]. Схожие антиоксидантные свойства отмечены для НЧ Au [99, 100], НЧ оксидов Co [101] и Fe [102]. Например, Gao с соавторами [102] описали POD-подобную активность НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, которые способны вступать в реакцию с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, преобразуя ее в гидроксильные радикалы (реакция Фентона). Было показано, что каталитическая активность НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> увеличивается с уменьшением размера частиц и проявляется в кислой среде (рН 4.8) [14, 98, 102]. Особое значение имела способность атомов в составе НЧ быстро менять степень окисления в связи с высокой подвижностью электронов [96]. Проявление каталитической активности НЧ зависело от их типа, формы, размеров, концентраций и экспозиции. Поскольку в стрессовых условиях активность НЧ как “наноэнзимов” может усиливаться, в исследованиях по действию НЧ на растения в условиях абиотического стресса они, как правило, снижали окислительные риски.

Некоторые авторы придерживаются точки зрения, согласно которой НЧ действуют как индукторы неспецифических (универсальных) защитных механизмов, активируя гены, кодирующие протеинкиназы, антиоксиданты, осмолиты и другие молекулы с протекторными свойствами [103]. Например, НЧ Ag регулировали экспрессию генов, кодирующих белки-переносчики анионов, и ферменты, вовлеченные в протеолитические процессы [104], а также изменяли экспрессию генов, кодирующих аквапорины [58]. Показано участие многих НЧ в индукции Ca<sup>2+</sup>-зависимых сигналь-

ных путей [20, 90, 91]. Способствуя индукции стрессовых сигнальных путей, НЧ “включают” ассоциированные с ними гены, увеличивая стрессоустойчивость растений [91]. Так, в литературе имеются сведения о том, что НЧ Ag регулировали экспрессию генов, вовлеченных в стрессовый ответ на засоление [104], засуху [105], а НЧ ZnO изменяли экспрессию генов холодового ответа [61]. Показано влияние многих НЧ на экспрессию генов, кодирующих синтез осмолитов и ферментов АОС [18, 28, 45, 58, 59]. Важно также отметить, что многие НЧ, такие как Cu, Fe, Ni, Mn, Si, Co, Se и Zn, могут активировать ферменты и белки, а ионы, освобожденные из НЧ, способны замещать металлы в составе некоторых ферментов [106]. Так, ионы  $Mn^{2+}$  эффективно активировали РНК-полимеразу хлоропластов, ФЕП-карбоксикиназу и Mn-супероксиддисмутазу [107], а НЧ Zn и Se стимулировали активность  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы и  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -АТФ-азы у растений в условиях абиотического стресса [87].

Более того, установлено, что под влиянием НЧ изменялся уровень экспрессии ряда микроРНК. Так, НЧ Au влияли на экспрессию miR398, miR408, miR164, miR167 и miR169 у растений *A. thaliana* в оптимальных условиях. При этом экспрессия miR398 была связана с работой генов, регулирующих прорастание семян и рост растений, за счет влияния на пути передачи ауксинового сигнала. Изменение экспрессии miR169, miR368 и miR408 влияло на размеры проростков, развитие их корневой системы, и было причиной раннего цветения растений и ускоренного созревания семян [48].

Упоминаются также факты влияния НЧ на экспрессию генов, кодирующих белки фотосинтетического аппарата (ФСА). Например, НЧ  $TiO_2$  изменяли экспрессию генов, участвующих в синтезе РБФК/О [108] и кодирующих белки ССК [94, 109], а НЧ ZnO – генов, кодирующих белки синтеза хлорофиллов [40]. Учитывая все перечисленные факты, можно предполагать, что НЧ способны “перепрограммировать” онтогенез растений, усиливая или угнетая экспрессию генов и микроРНК, вовлеченных в регуляцию роста и развития, процесса фотосинтеза, антиоксидантного статуса и стрессового ответа.

Таким образом, НЧ металлов и их оксидов действуют как стрессовые сигнальные молекулы, которые в растительном организме “включают” молекулярные механизмы адаптационных процессов, незадействованные обычно в нормальных условиях [89, 110]. Под влиянием абиотических стрессовых факторов может наблюдаться некоторое наложение программы, запущенной НЧ, на программу адаптации растений к конкретному стрессору, и это вызывает дополнительные адаптационные эффекты. В нашем исследо-

вании с использованием НЧ Au было установлено, что в условиях действия низких температур они усиливали программу холодовой адаптации озимой пшеницы, ингибируя ростовые процессы, поддерживая на высоком уровне фотосинтетическую активность и накопление растворимых сахаров, выполняющих многочисленные протекторные функции [110]. Изучая влияние НЧ  $TiO_2$  на растения нута в условиях охлаждения, Mohammedi с соавт. [51] сделали вывод, что НЧ включают “конфронтационный метаболизм” (confrontation metabolism), стимулируя дополнительную индукцию стрессового ответа растений. Отметим, что в целом ряде обзорных исследований убедительно показана роль многих НЧ как адаптогенов, усиливающих устойчивость растений к различным абиотическим факторам [14, 90, 91, 94, 105]. Решающее значение в этом процессе играла способность НЧ выступать в качестве детоксификаторов АФК, индукторов АОС и регуляторов работы ФСА [14, 91].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы последних лет свидетельствует о двойственной роли НЧ металлов и их оксидов в регуляции про-/антиоксидантного баланса, причем с одной стороны, НЧ усиливали генерацию АФК, вызывая интенсификацию окислительных процессов в клетках и тканях растений, а с другой, регулировали их интенсивность, активируя компоненты АОС. Важно, что под влиянием абиотических стрессовых факторов НЧ действовали как адаптогены, усиливая антиоксидантную защиту растений. Хотя в целом ряде исследований показано позитивное влияние многих НЧ на сельскохозяйственные объекты, широкое их использование в агробиологии ограничено, поскольку эффекты НЧ зависят от ряда факторов (тип, размер, заряд и доза НЧ, способ обработки растений и длительность экспозиции, особенности объектов, сопутствующих условий), а это увеличивает экологические риски от их применения. Необходимы дальнейшие исследования НЧ с целью разработки четких рекомендаций по их использованию не только как индукторов роста и развития растений, но и как антистрессовых адаптогенов. Для этого важно продолжить изучение механизмов действия НЧ и факторов, определяющих их эффекты на растения. Подчеркнем, что механизмы действия НЧ на растения исследуются, однако пока несут гипотетический характер. Изучение возможностей генетического “перепрограммирования” растений под влиянием НЧ может стать одним из перспективных направлений современной экспериментальной биологии. Важным аспектом должно быть изучение особенностей накопления разных типов НЧ в

растительном организме и возможной их транслокации по пищевым цепям. Такого рода исследований необходимы для оценки токсикологических рисков от использования НЧ в биологии и сельском хозяйстве как адаптогенов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700044–6).

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kolupaev Y.E., Karpets Y.V., Kabashnikova L.F. Antioxidative system of plants: cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (review) // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. P. 441.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683819050089>
2. Kerchev P.I., Van Breusegem F. Improving oxidative stress resilience in plants // *Plant J.* 2022. V. 109. P. 359.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.15493>
3. Swanson S., Gilroy S. ROS in plant development // *Physiol. Plant.* 2010. V. 138. P. 384.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01313.x>
4. Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 141.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
5. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology // *Environ. Exp. Bot.* 2015. V. 109. P. 212.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
6. Noctor G., Lelarge-Trouverie C., Mhamdi A. The metabolomics of oxidative stress // *Phytochem.* 2015. V. 112. P. 33.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.002>
7. Sanzari I., Leone A., Ambrosone A. Nanotechnology in plant science: to make a long story short // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019. V. 7. P. 120.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00120>
8. Solano R., Patico-Ruiz D., Tejada-Benitez L., Herrera A. Metal- and metal/oxide-based engineered nanoparticles and nanostructures: a review on the applications, nanotoxicological effects, and risk control strategies // *Environ. Sci. Poll. Res.* 2021. V. 28. P. 16962.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-12996-6>
9. Goswami P., Yadav S., Mathur J. Positive and negative effects of nanoparticles on plants and their applications in agriculture // *Plant Sci. Today.* 2019. V. 6. P. 232.  
<https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.2.502>
10. Chen H. Metal based nanoparticles in agricultural system: behavior, transport, and interaction with plants // *Chem. Spec. Bioavailab.* 2018. V. 30. P. 123.  
<https://doi.org/10.1080/09542299.2018.1520050>
11. Venzhik Yu.V., Moshkov I.E., Dykman L.A. Influence of nanoparticles of metals and their oxides on the photosynthetic apparatus of plants // *Biol. Bull.* 2021a. V. 48. P. 140.  
<https://doi.org/10.1134/S106235902102014X>
12. Venzhik Yu.V., Moshkov I.E., Dykman L.A. Gold nanoparticles in plant physiology: principal effects and prospects of application // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021b. V. 68. P. 401.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443721020205>
13. Hu P., An J., Faulkner M.M., Wu H., Li Z., Tian X., Giraldo J.P. Nanoparticle charge and size control foliar delivery efficiency to plant cells and organelles // *ACS Nano.* 2020. V. 14. P. 7970.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.9b09178>
14. Liu Y., Xiao Z., Chen F., Yue L., Zou H., Lyu J., Wang Z. Metallic oxide nanomaterials act as antioxidant nanozymes in higher plants: trends, meta-analysis, and prospect // *Sci. Total. Environ.* 2021. V. 780. P. 146578.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146578>
15. Panda K.K., Achary V.M., Krishnaveni R., Padhi B.K., Sarangi S.N., Sahu S.N., Panda B.B. *In vitro* biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants // *Toxicol. In Vitro.* 2011. V. 25. P. 1097.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.03.008>
16. Oukarroum A., Barhoumi L., Pirastru L., Dewez D. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba* // *Environ. Toxicol. Chem.* 2013. V. 32. P. 902.  
<https://doi.org/10.1002/etc.2131>
17. Jiang H.-Sh., Qiu X.-N., Li G.-B., Li W., Yin L.-Y. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza* // *Environ. Toxicol. Chem.* 2014. V. 33. P. 1398.  
<https://doi.org/10.1002/etc.2577>
18. Nair P.M.G., Chung I.M. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings // *Chemosphere.* 2014a. V. 112. P. 105.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.056>
19. Bagherzadeh Homae M., Ehsanpour A.A. Silver nanoparticles and silver ions: oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro // *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2016. V. 57. P. 544.  
<https://doi.org/10.1007/s13580-016-0083-z>
20. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., Tsiurkina K., Smolich I., Lawson T., Subramaniam S., Golovko V., Anderson D., Sokolik A., Colbeck I., Demidchik V. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants // *Plant J.* 2016. V. 85. P. 245.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.13105>
21. Mohamed A.K.S.H., Qayyum M.F., Abdel-Hadi Ah.M., Rehman R.A., Ali Sh., Rizwan M. Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat // *Arch. Agron. Soil*

- Sci. 2017. V. 63. P. 1736.  
<https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1300256>
22. Arora S., Sharma P., Kumar S., Nayan R., Khanna P.K., Zaidi M.G.H. Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea* // Plant Growth Regul. 2012. V. 66. P. 303.  
<https://doi.org/10.1007/s10725-011-9649-z>
  23. Gunjan B., Zaidi M.G.H., Sandeep A. Impact of gold nanoparticles on physiological and biochemical characteristics of *Brassica juncea* // J. Plant Biochem. Physiol. 2014. V. 2. P. 3.  
<https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000133>
  24. Wan Y., Li J., Ren H., Huang J., Yuan H. Physiological investigation of gold nanorods toward watermelon // J. Nanosci. Nanotechnol. 2014. V. 14. P. 6089.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8853>
  25. Rajeshwari A., Suresh S., Chandrasekaran N., Mukherjee A. Toxicity evaluation of gold nanoparticles using an *Allium cepa* bioassay // RSC Adv. 2016. V. 6. P. 24000.  
<https://doi.org/10.1039/c6ra04712b>
  26. Ndeh N.T., Maensiri S., Maensiri D. The effect of green synthesized gold nanoparticles on rice germination and roots // Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. 2017. V. 8. P. 035008.  
<https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa724a>
  27. Zhao L., Peng B., Hernandez-Viezcas J.A., Rico C., Sun Y., Peralta-Videa J.R., Tang X., Niu G., Jin L., Varela-Ramirez A., Zhang J.Y. Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO<sub>2</sub> nanoparticles: cross talk among H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, heat shock protein, and lipid peroxidation // ACS Nano. 2012. V. 6. P. 9615.  
<https://doi.org/10.1021/nn302975u>
  28. Ma C.X., Chhikara S., Xing B.S., Musante C., White J.C., Dhankher O.P. Physiological and molecular response of *Arabidopsis thaliana* (L.) to nanoparticle cerium and indium oxide exposure // ACS Sustainable Chem. Eng. 2013. V. 1. P. 768.  
<https://doi.org/10.1021/sc400098h>
  29. Rico C.M., Morales M.I., Barrios A.C., McCreary R., Hong J., Lee W.Y., Nunez J., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. Effect of cerium oxide nanoparticles on the quality of rice (*Oryza sativa* L.) grains // J. Agric. Food Chem. 2013. V. 61. P. 11278.  
<https://doi.org/10.1021/jf404046v>
  30. Ma X., Wang Q., Rossi L., Zhang W. Cerium oxide nanoparticles and bulk cerium oxide leading to different physiological and biochemical responses in *Brassica rapa* // Environ. Sci. Technol. 2015. V. 50. P. 6793.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04111>
  31. Nekrasova G.F., Ushakova O.S., Ermakov A.E., Uimin M.A., Byzov I.V. Effects of copper(II) ions and copper oxide nanoparticles on *Elodea densa* Planch. // Russ. J. Ecol. 2011. V. 42. P. 458.  
<https://doi.org/10.1134/S1067413611060117>
  32. Dimkpa C.O., McLean J.E., Latta D.E., Manangón E., Britt D.W., Johnson W.P., Boyanov M.I., Anderson A.J. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat // J. Nanopart. Res. 2012. V. 14. P. 1.  
<https://doi.org/10.1007/s11051-012-1125-9>
  33. Shaw A.K., Hossain Z. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings // Chemosphere. 2013. V. 93. P. 906.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.044>
  34. Nair P.M.G., Chung I.M. Impact of copper oxide nanoparticles exposure on *Arabidopsis thaliana* growth, root system development, root lignification, and molecular level changes // Environ. Sci. Pollut. Res. 2014b. V. 21. P. 12709.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3210-3>
  35. Nair P.M.G., Kim S.H., Chung I.M. Copper oxide nanoparticle toxicity in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: physiological and molecular level responses of in vitro grown plants // Acta Physiol. Plant. 2014. V. 36. P. 2947.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-014-1667-9>
  36. Da Costa M.V.J., Sharma P.K. Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa* // Photosynthetica. 2016. V. 54. P. 110.
  37. Asadi-Kavan Z., Khavari-Nejad R.A., Iranbakhsh A., Najafi F. Cooperative effects of iron oxide nanoparticle ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and citrate on germination and oxidative system of evening primrose (*Oenothera biennis* L.) // J. Plant Interact. 2020. V. 15. P. 166.  
<https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1774671>
  38. Castiglione M.R., Giorgetti L., Cremonini R., Bottega S., Spanò C. Impact of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Vicia narbonensis* L.: potential toxicity effects // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 1471.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-014-0649-5>
  39. Mukherjee A., Peralta-Videa J.R., Bandyopadhyay S., Rico C.M., Zhao L., Gardea-Torresdey J.L. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil // Metallomics. 2014. V. 6. P. 132.  
<https://doi.org/10.1039/c3mt00064h>
  40. Wang P., Lombi E., Zhao F.-J., Kopittke P.M. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 699.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>
  41. Hussain A., Ali S., Rizwan M., ur Rehman M.Z., Javed M.R., Imran M., Chatha S.A., Nazir R. Zinc oxide nanoparticles alter the wheat physiological response and reduce the cadmium uptake by plants // Environ. Pollut. 2018. V. 242. P. 1518.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.036>
  42. Akanbi-Gada M.A., Ogunkunle Clement O., Vishwakarma V., Viswanathan K., Fatoba P.O. Phytotoxicity of nano-zinc oxide to tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.): Zn uptake, stress enzymes response and influence on non-enzymatic antioxidants in fruits // Environ. Technol. Innov. 2019. V. 14. P. 100325.  
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100325>
  43. Khoshgofarmanesh A.H., Markarian Sh. Antioxidant response of wheat to tire rubber ash and ZnO nanoparticles and ionic zinc exposure in nutrient solu-



- tion culture // *Acta Physiol. Plant.* 2022. V. 44. P. 50.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-022-03384-9>
44. Ma X., Quah B. Effects of surface charge on the fate and phytotoxicity of gold nanoparticles to *Phaseolus vulgaris* // *J. Food Chem. Nanotechnol.* 2016. V. 2. P. 57.  
<https://doi.org/10.17756/jfcn.2016-011>
  45. Ferrari E., Barbero F., Busquets-Fité M., Franz-Wachtel M., Köhler H.-R., Puntès V., Kemmerling B. Growth-promoting gold nanoparticles decrease stress responses in *Arabidopsis* seedlings // *Nanomaterials.* 2021. V. 11. P. 3161.  
<https://doi.org/10.3390/nano11123161>
  46. Song U., Jun H., Waldman B., Roh J., Kim Y., Yi J., Lee E.J. Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO<sub>2</sub> and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013. V. 93. P. 60.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.033>
  47. Dutta Gupta S., Agarwal A., Pradhan S. Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (AgNPs) on rice seedling growth: an insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns // *Ecotox. Environ. Saf.* 2018. V. 161. P. 624.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.023>
  48. Kumar V., Guleria P., Kumar V., Yadav S.K. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana* // *Sci. Total Environ.* 2013. V. 461. P. 462.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.018>
  49. Du W., Gardea-Torresdey J.L., Ji R., Yin Y., Zhu J., Peralta-Videa J.R., Guo H. Physiological and biochemical changes imposed by CeO<sub>2</sub> nanoparticles on wheat: a life cycle field study // *Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 49. P. 11884.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03055>
  50. Laware S.L., Raskar Sh. Effect of titanium dioxide nanoparticles on hydrolytic and antioxidant enzymes during seed germination in onion // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2014. V. 3. P. 749.
  51. Mohammadi R., Maali-Amiri R., Mantri N. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. P. 768.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443714050124>
  52. Lian J., Zhao L., Wu J., Xiong H., Bao Y., Zeb A., Tang J., Liu W. Foliar spray of TiO<sub>2</sub> nanoparticles prevails over root application in reducing Cd accumulation and mitigating Cd-induced phytotoxicity in maize (*Zea mays* L.) // *Chemosphere.* 2020. V. 239. P. 124794.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124794>
  53. Lee S., Kim S., Kim S., Lee I. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum* // *Environ. Sci. Poll. Res.* 2013. V. 20. P. 848.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-012-1069-8>
  54. Rostami M., Talarposhti R.M., Mohammadi H., Demyan M.S. Morpho-physiological response of Saffron (*Crocus sativus* L.) to particle size and rates of zinc fertilizer // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 2019. V. 50. P. 1250.  
<https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1614602>
  55. Adrees M., Khan Z.S., Hafëez M., Rizwan M., Hussain K., Asrar M., Alyemeni M.N., Wijaya L., Ali S. Foliar exposure of zinc oxide nanoparticles improved the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) and decreased cadmium concentration in grains under simultaneous Cd and water deficient stress // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. V. 208. P. 111627.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111627>
  56. Vishwakarma K., Upadhyay N., Singh J., Liu S., Singh V.P., Prasad S.M., Chauhan D.K., Tripathi D.K., Sharma S. Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) on *Brassica* sp // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1501.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01501>
  57. Kreslavski V., Ivanov A., Shmarev A., Khudyakova A., Kosobryukhov A. Influence of iron nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) on the growth, photosynthesis and antioxidant balance of wheat plants (*Triticum aestivum*) // *BIO Web of Conferences.* 2022. V. 42: 01023.  
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20224201023>
  58. Qian H., Peng X., Han X., Ren J. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana* // *J. Environ. Sci.* 2013. V. 25. P. 1947.  
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60301-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5)
  59. Liwei Sun., Zhengwei FuKatiyar P., Yadu B., Korram J., Satnami M.L., Kumar M., Keshavkant S. Titanium nanoparticles attenuates arsenic toxicity by up-regulating expressions of defensive genes in *Vigna radiata* L. // *J. Environ. Sci.* 2020 V. 92. P. 18.  
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.02.013>
  60. Mohammadi R., Maali-Amiri R., Abbasi A. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on chickpea response to cold stress // *Biol. Trace Elem. Res.* 2013. V. 152. P. 403.  
<https://doi.org/10.1007/s12011-013-9631-x>
  61. Song Y., Jiang M., Zhang H., Li R. Zinc oxide nanoparticles alleviate chilling stress in rice (*Oryza sativa* L.) by regulating antioxidative system and chilling response transcription factors // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 2196.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26082196>
  62. Wahid I., Kumari S., Ahmad R., Hussain S.J., Alamri S., Siddiqui M.H., Khan M.I. Silver nanoparticle regulates salt tolerance in wheat through changes in ABA concentration, ion homeostasis, and defense systems // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 1506.  
<https://doi.org/10.3390/biom10111506>
  63. Askary M., Talebi S.M., Amini F., Bangan A.D. Effects of iron nanoparticles on *Mentha piperita* L. under salinity stress // *Biologija.* 2017. V. 63. P. 65.  
<https://doi.org/10.6001/biologija.v63i1.3476>
  64. Moradbeygi H., Jamei R., Heidari R., Darvishzadeh R. Investigating the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense by applying iron oxide nanoparticles in *Dracocephalum moldavica* L. plant under salinity stress // *Sci. Hortic.* 2020. V. 272. P. 109537.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109537>

65. Gohari G., Mohammadi A., Akbari A., Panahirad S., Dadpour M.R., Fotopoulos V., Kimura S. Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub> NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica* // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57794-1>
66. Shah T., Latif S., Saeed F., Ali I., Ullah S., Alsahli A.A., Jan S., Ahmad P. Seed priming with titanium dioxide nanoparticles enhances seed vigor, leaf water status, and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) under salinity stress // J. King Saud Univer. Sci. 2021. V. 33. P. 101207. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.10.004>
67. Abdel Latef A.A., Abu Alhmad M.F., Abdelfattah K.E. The possible roles of priming with ZnO nanoparticles in mitigation of salinity stress in lupine (*Lupinus termis*) plants // J. Plant Growth Regul. 2017. V. 36. P. 60. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9618-x>
68. Alabdallah N.M., Alzahrani H.S. The potential mitigation effect of ZnO nanoparticles on (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) metabolism under salt stress conditions // Saudi J. Biol. Sci. 2020. V. 27. P. 3132. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.005>
69. Faizan M., Bhat J.A., Chen C., Alyemini M.N., Wijaya L., Ahmad P., Yu F. Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) induce salt tolerance by improving the antioxidant system and photosynthetic machinery in tomato // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 161. P. 122. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.002>
70. Djanaguiraman M., Nair R., Giraldo J.P., Vara Prasad P.V. Cerium oxide nanoparticles decrease drought-induced oxidative damage in sorghum leading to higher photosynthesis and grain yield // ACS Omega. 2018. V. 3. P. 14406. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01894>
71. Van Nguyen D., Nguyen H.M., Le N.T., Nguyen K.H., Nguyen H.T., Le H.M., Nguyen A.T., Dinh N.T., Hoang S.A., Van Ha C. Copper nanoparticle application enhances plant growth and grain yield in maize under drought stress conditions // J. Plant Growth Reg. 2022. V. 41. P. 364. <https://doi.org/10.1101/2020.02.24.963132>
72. Mohasseli V., Farbood F., Moradi A. Antioxidant defense and metabolic responses of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) to Fe-nano-particles under reduced irrigation regimes // Ind. Crops Prod. 2020. V. 149. P. 112338. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112338>
73. Palmqvist N.M., Seisenbaeva G.A., Svedlindh P., Kessler V.G. Maghemite nanoparticles acts as nanozymes, improving growth and abiotic stress tolerance in *Brassica napus* // Nanoscale Res. Lett. 2017. V. 12. P. 631. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2404-2>
74. Aghdam M.T., Mohammadi H., Ghorbanpour M. Effects of nanoparticulate anatase titanium dioxide on physiological and biochemical performance of *Linum usitatissimum* (*Linaceae*) under well-watered and drought stress conditions // Rev. Braz. Bot. 2016. V. 39. P. 139. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0227-x>
75. Sun L., Song F., Guo J., Zhu X., Liu S., Liu F., Li X. Nano-ZnO-induced drought tolerance is associated with melatonin synthesis and metabolism in maize // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 782. <https://doi.org/10.3390/ijms21030782>
76. Dai Sh., Wang B., Song Y., Xie Zh., Li Ch., Li Sh., Huang Y., Jiang M. Astaxanthin and its gold nanoparticles mitigate cadmium toxicity in rice by inhibiting cadmium translocation and uptake // Sci. Total. Environ. 2021. V. 786. P. 147496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147496>
77. Jiang M., Dai Sh., Wang B., Xie Zh., Li J., Wang L., Li Sh., Tan Yu., Tian B., Shu Q., Huang O. Gold nanoparticles synthesized using melatonin suppress cadmium uptake and alleviate its toxicity in rice // Environ. Sci. Nano. 2021. V. 8. P. 1042. <https://doi.org/10.1039/d0en01172>
78. Mohammadi H., Amani-Ghadim A.R., Matin A.A., Ghorbanpour M. FeO nanoparticles improve physiological and antioxidative attributes of sunflower (*Helianthus annuus*) plants grown in soil spiked with hexavalent chromium // 3 Biotech. 2020. V. 10. P. 19. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2002-3>
79. Bidi H., Fallah H., Niknejad Y., Tari D.B. Iron oxide nanoparticles alleviate arsenic phytotoxicity in rice by improving iron uptake, oxidative stress tolerance and diminishing arsenic accumulation // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 163. P. 348. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.020>
80. Manzoor N., Ahmed T., Noman M., Shahid M., Nazir M.M., Ali L., Alnusaire T.S., Li B., Schulin R., Wang G. Iron oxide nanoparticles ameliorated the cadmium and salinity stresses in wheat plants, facilitating photosynthetic pigments and restricting cadmium uptake // Sci. Total Environ. 2021. V. 769. P. 145221. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145221>
81. Ahmed T., Noman M., Manzoor N., Shahid M., Abdulrahman M., Ali L., Wang G., Hashem A., Al-Arjani A.B., Alqarawi A.A., Abd Allah E.F., Li B. Nanoparticle-based amelioration of drought stress and cadmium toxicity in rice via triggering the stress responsive genetic mechanisms and nutrient acquisition // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2021. V. 209. P. 111829. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111829>
82. Konate A., He X., Zhang Z., Ma Y., Zhang P., Alugongo G.M., Rui Y. Magnetic (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles reduce heavy metals uptake and mitigate their toxicity in wheat seedling // Sustainability. 2017. V. 9. P. 790. <https://doi.org/10.3390/su9050790>
83. Singh J., Lee B.K. Influence of nano-TiO<sub>2</sub> particles on the bioaccumulation of Cd in soybean plants (*Glycine max*): a possible mechanism for the removal of Cd from the contaminated soil // J. Environ. Manage. 2016. V. 170. P. 88. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.01.015>

84. Rizwan M., Ali S., Ali B., Adrees M., Arshad M., Hus-sain A., ur Rehman M.Z., Waris A.A. Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat // *Chemosphere*. 2019. V. 214. P. 269. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120>
85. Venkatachalam P., Jayaraj M., Manikandan R., Geetha N., Rene E.R., Sharma N.C., Sahi S.V. Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) alleviate heavy metal-induced toxicity in *Leucaena leucocephala* seedlings: a physiochemical analysis // *Plant Physiol. Biochem*. 2017. V. 110. P. 59. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.022>
86. Rizwan M., Ali Sh., Ali B., Adrees M., Arshad M., Hus-sain A., Zia ur Rehman M., Abdul Waris A. Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat // *Chemosphere*. 2019. V. 214. P. 269. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120>
87. Zeeshan M., Hu Y.X., Siddique Afridi M., Ahmad B., Ahmad Sh., Muhammad Ih., Hale B., Iqbal A., Farooq S., Wu H.Y., Zhou X.B. Interplay of ZnONPs and/or SeNPs induces arsenic tolerance in soybean by regulation of antioxidants pool, *WRKY* genes, and expression of arsenic transporters // *Environ. Exp. Bot*. 2022. V. 195. P. 104783. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104783>
88. Ковалева Н.Ю., Раевская Е.Г., Роцин А.В. Проблемы безопасности наноматериалов: нанобезопасность, нанотоксикология, наноинформатика // *Химическая безопасность*. 2017. Т. 1. С. 44. <https://doi.org/10.25514/CHS.2017.2.10982>
89. Khan M.R., Adam V., Rizvi T.F., Zhang B., Ahamad F., Joško I., Zhu Y., Yang M., Mao C. Nanoparticle-plant interactions: two-way traffic // *Small*. 2019. V. 15. P. e1901794. <https://doi.org/10.1002/smll.201901794>
90. Sarraf M., Vishwakarma K., Kumar V., Arif N., Das S., Johnson R., Janeeshma E., Puthur J.T., Aliniaefard S., Chauhan D.K., Fujita M. Metal/metalloid-based nanomaterials for plant abiotic stress tolerance: an overview of the mechanisms // *Plants*. 2022. V. 11. P. 316. <https://doi.org/10.3390/plants11030316>
91. Carpenter A.W., Worley B.V., Slomberg D.L., Schoenfisch M.H. Dual action antimicrobials: nitric oxide release from quaternary ammonium-functionalized silica nanoparticles // *Biomacromolecules*. 2012. V. 13. P. 3334. <https://doi.org/10.1038/srep15195>
92. Chandra S., Chakraborty N., Dasgupta A., Sarkar J., Panda K., Acharya K. Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants // *Sci. Rep*. 2015. V. 5. P. 15195. <https://doi.org/10.1038/srep15195>
93. Khan M.N., Mobin M., Abbas Z.K., AlMutairi K.A., Siddiqui Z.H. Role of nanomaterials in plants under challenging environments // *Plant Physiol. Biochem*. 2017. V. 110. P. 194. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038>
94. Kelly K.L., Coronado E., Zhao L.L., Schatz G.C. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment // *J. Phys. Chem. B*. 2003. V. 107. P. 668. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>
95. Das S., Debnath N., Pradhan S., Goswami A. Enhancement of photon absorption in the light-harvesting complex of isolated chloroplast in the presence of plasmonic gold nanosol – a nanobionic approach towards photosynthesis and plant primary growth augmentation // *Gold Bull*. 2017. V. 50. P. 247. <https://doi.org/10.1007/s13404-017-0214-z>
96. Wei H., Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes // *Chem. Sov. Rev*. 2013. V. 42. P. 6060. <https://doi.org/10.1039/c3cs35486e>
97. Manea F., Houillon F.B., Pasquato L., Scrimin P. Nanozymes: gold-nanoparticle based transphosphorylation catalysts // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2004. V. 116. P. 6291. <https://doi.org/10.1002/ange.200460649>
98. Korsvik C., Patil S., Seal S., Self W.T. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles // *Chem. Commun*. 2007. V. 10. P. 1056. <https://doi.org/10.1039/b615134e>
99. Jv Y., Li B., Cao R. Positively-charged gold nanoparticles as peroxidase mimic and their application in hydrogen peroxide and glucose detection // *Chem. Commun*. 2010. V. 46. P. 8017. <https://doi.org/10.1039/c0cc0>
100. He W., Zhou Y.T., Wamer W.G., Hu X., Wu X., Zheng Z., Boudreau M.D., Yin J.-J. Intrinsic catalytic activity of Au nanoparticles with respect to hydrogen peroxide decomposition and superoxide scavenging // *Biomaterials*. 2013. V. 34. P. 765. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.010>
101. Mu J., Zhang L., Zhao M., Wang Y. Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as an efficient catalase mimic: properties, mechanism and its electrocatalytic sensing application for hydrogen peroxide // *J. Mol. Catal. A Chem*. 2013. V. 378. P. 30. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.05.016>
102. Gao L., Zhuang J., Nie L., Zhang J., Zhang Y., Gu N., Wang T., Feng J., Yang D., Perret S., Yan X. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles // *Nat. Nanotechnol*. 2007. V. 2. P. 577. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.260>
103. Kisku K., Naik U.C. Nanobiotechnology: a process to combat abiotic stress in crop plants // *Nanobiotechnology: mitigation of abiotic stress in plants* / Eds. Al-Khayri J.M., Ansari M.I., Singh A.K. Springer: Springer Nature Switzerland AG, 2021. P. 139.
104. Kohan-Baghkheirati E., Geisler-Lee J. Gene expression, protein function and pathways of *Arabidopsis thaliana* responding to silver nanoparticles in comparison to silver ions, cold, salt, drought, and heat //

- Nanomaterials. 2015. V. 5. P. 436.  
<https://doi.org/10.3390/nano5020436>
105. *Almutairi Z.M.* Influence of silver nano-particles on the salt resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) during germination // *Int. J. Agric. Biol.* 2016. V. 18. P. 449.  
<https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0114>
106. *Vuong L.D.* Nanoparticles for the improved crop production // *Nanotechnology for agriculture: crop production and protection* / Eds. Panpatte D.G., Jhala Y.K. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2019. P. 85
107. *Ye Yu., Medina-Velo I.A., Cota-Ruiz K., Moreno-Olivas F., Gardea-Torresdey J.L.* Can abiotic stresses in plants be alleviated by manganese nanoparticles or compounds? // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019. V. 184: 109671.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109671>
108. *Hasanpour H., Maali-Amiri R., Zeinali H.* Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on metabolic limitations to photosynthesis under cold in chickpea // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 779.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060096>
109. *Ze Y., Liu C., Wang L., Hong M., Hong F.* The regulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the expression of light-harvesting complex II and photosynthesis of chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* // *Biol. Trace Elem. Res.* V. 143. P. 1131.  
<https://doi.org/10.1007/s12011-010-8901-0>
110. *Venzhik Yu., Deryabin A., Popov V., Dykman L., Moshkov I.* Gold nanoparticles as adaptogens increasing the freezing tolerance of wheat seedlings // *Environ. Sci. Poll. Res.* 2022. V. 29. P. 55235.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-19759-x>

УДК 581.1

## ВОЗМОЖНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ

© 2023 г. Т. Г. Шибаетова<sup>а</sup>, \*, А. В. Мамаев<sup>а</sup>, А. Ф. Титов<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр “Карельский научный центр РАН”, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: shibaeva@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 15.10.2022 г.

После доработки 19.10.2022 г.

Принята к публикации 20.10.2022 г.

В противоположность естественному фотопериоду, включающему чередование дня и ночи в суточном цикле, круглосуточное освещение обеспечивает непрерывное поступление световой энергии, необходимой для фотосинтеза, вызывает постоянное фотоокислительное воздействие, сигнальное воздействие на фоторецепторы и приводит к рассогласованию внутренних (циркадных) биоритмов с внешним циклом свет/темнота (циркадная асинхрония). У многих видов растений в условиях круглосуточного освещения развивается характерный и потенциально летальный межжилковый хлороз и некроз. Данный феномен (фотоповреждение листьев растений в условиях длинных фотопериодов, включая круглосуточное освещение) был описан более 90 лет назад, однако причины этого до сих пор не вполне ясны. Хотя понимание его биологической природы важно не только в теоретическом плане, но и с практической точки зрения, поскольку выращивание растений в условиях круглосуточного освещения при относительно невысокой плотности потока фотонов считается потенциально одним из наиболее эффективных способов экономии ресурсов и повышения продуктивности растений в теплицах и на фабриках растений с искусственным освещением. В обзоре обобщены и проанализированы имеющиеся на сегодняшний день литературные и собственные данные в поддержку или опровержение гипотезы о накоплении углеводов и, в частности, гиперкумуляции крахмала, в листьях как основной причине появления фотоповреждений у растений, находящихся в условиях круглосуточного освещения или длинных фотопериодов. Проведенный анализ большого числа работ свидетельствует о том, что накопление углеводов не является главной и тем более единственной причиной повреждения листьев растений при круглосуточном освещении, хотя и исключить роль этого фактора в развитии фотоповреждений тоже нельзя. По мнению авторов, в процессе появления и развития фотоповреждений, вызванных круглосуточным освещением, участвует не один, а несколько факторов одновременно (фотоокисление, стресс-индуцированное старение, циркадная асинхрония и др.). При этом удельный вклад каждого из них может существенно варьировать в зависимости от биологических особенностей объекта (видовая и сортовая принадлежность, возраст и фаза развития) и условий внешней среды.

**Ключевые слова:** круглосуточное освещение, углеводный обмен, фотопериод, хлороз

**DOI:** 10.31857/S0015330322600541, **EDN:** GKXQOW

### ВВЕДЕНИЕ

Свет необходим фотосинтезирующим организмам для нормальной жизнедеятельности как источник энергии, обеспечивающей многие их функции и потребности. Вместе с тем, избыток света может быть опасен и вреден для них. Хоро-

шо известно, что повышение фотосинтетической активности растений с увеличением освещенности достигает в определенный момент предела (светового насыщения), после чего избыток света выступает как агрессивный фактор, вызывая фотоингибирование, фотодинамическое разрушение фотосинтетического аппарата и даже гибель клеток [1, 2]. Помимо высокой освещенности, избыток света может возникать в условиях длинных фотопериодов. Многочисленные данные свидетельствуют о негативном влиянии длинных фото-

**Сокращения:** ИДО – интеграл дневного освещения, CL – круглосуточное освещение (от англ. *Continuous Lighting*), LMA – сухая масса листа на единицу площади (от англ. *Leaf Mass per Area*).

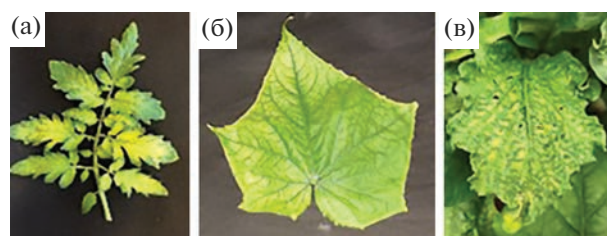
периодов (>17–20 ч), и прежде всего 24-часового, на рост и продуктивность растений [3–5]. У многих видов растений в условиях круглосуточного освещения (CL, от англ. *Continuous Lighting*) развивается характерный и потенциально летальный межжилковый хлороз и некроз (рис. 1). Симптомы светового повреждения листьев при CL отмечены у таких культур как томат [3, 5–31], баклажан [28, 32–34], сладкий перец [14, 15, 28, 35–37], огурец [31, 38, 39], картофель [40–44] и некоторых других. В качестве возможных причин светового повреждения называют фотоокисление, индукцию процесса старения, циркадную асинхронность и др. [5, 20, 24]. Но в большинстве работ [3, 6, 11–13, 15, 16, 18, 32, 45, 46] авторы называют (или предполагают) главным фактором, вызывающим появление и развитие повреждений растений под влиянием CL, накопление в листьях большого количества крахмала и растворимых сахаров. В то же время имеется достаточно большое число работ [6, 20, 24, 25, 38], в которых связь между развитием хлороза и накоплением крахмала в условиях длинных фотопериодов не только не подтверждается, но даже опровергается.

Таким образом, несмотря на то, что феномен светового повреждения листьев у растений, находящихся в условиях CL был описан более 90 лет назад, причины этого до сих пор не вполне ясны. Хотя понимание биологической природы данного феномена важно не только в теоретическом плане, но и с практической точки зрения, поскольку выращивание растений в условиях CL при относительно невысокой плотности потока фотонов считается потенциально одним из наиболее эффективных способов экономии ресурсов и повышения продуктивности растений.

Данная работа посвящена обзору имеющихся на сегодняшний день литературных и собственных данных, поддерживающих или, наоборот, не поддерживающих гипотезу о накоплении углеводов и, в частности, гипераккумуляции крахмала, в листьях как основной причине появления фотоповреждений у растений, находящихся в условиях CL или длинных фотопериодов.

#### ДАнные в ПОДДЕРЖКУ ГИПОТЕЗЫ О ГИПЕРАККУМУЛЯЦИИ КРАХМАЛА КАК ОСНОВНОЙ ПРИЧИНЕ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ ЛИСТЬЕВ

В целом ряде работ, выполненных на томатах в условиях длинных фотопериодов, отмечалось высокое содержание крахмала и растворимых сахаров в листьях растений [10–12, 18, 47, 48] и было высказано предположение, что развитие световых повреждений, таких как хлороз и некроз листьев, связано с накоплением именно этих соединений. Было, в частности, установлено, что в молодых листьях томата в условиях CL ассимиляция



**Рис. 1.** Симптомы светового повреждения листьев растений томата (хлороз) (а), огурца (хлороз) (б) и баклажана (хлороз, некроз) (в), выращенных в условиях 24-часового фотопериода и постоянной температуры 23°C.

CO<sub>2</sub> и содержание крахмала увеличиваются в течение первых 6 сут., а затем, с появлением повреждений, поглощение CO<sub>2</sub> постепенно снижается, тогда как содержание крахмала продолжает увеличиваться, хотя и с меньшей скоростью [11]. Исследования на других видах растений подтвердили гипотезу о существовании определенной связи между развитием хлороза в условиях CL и накоплением крахмала и сахаров. Так, CL вызывало на 4–5 сут. развитие хлороза листьев у баклажана, что совпадало с пиком накопления крахмала, глюкозы и фруктозы, указывая, что после того как растения достигают максимума в содержании крахмала, у них начинает развиваться хлороз [32]. Что касается сахарозы, то данные относительно ее содержания более противоречивы. В одних работах наблюдалось увеличение содержания сахарозы наряду с крахмалом [12, 49], тогда как другие авторы [11, 32, 50, 51] отмечали более низкое содержание сахарозы в листьях при CL. В ряде исследований было показано, что у растений томата [11, 12, 52] и баклажана [32] в условиях CL, а также у огурца при низкотемпературном стрессе [53] избыточное накопление крахмала в листьях может нарушать структуру и функциональную активность хлоропластов, приводя к развитию хлороза. Увеличение содержания крахмала при длинных фотопериодах происходит, вероятно, в результате его постепенного ежедневного накопления, пока потребности акцепторов удовлетворяются за счет пулов гексоз и сахарозы [12, 32, 54, 55].

Как известно, органы, производящие и потребляющие ассимиляты, образуют в растении единую, хорошо сбалансированную донорно-акцепторную систему [56, 57]. Первичными донорами являются фотосинтезирующие взрослые зеленые листья, снабжающие ассимилятами все другие органы и ткани, а гетеротрофные части растения, как правило, выступают в роли акцепторов. Интенсивность, направленность транспорта ассимилятов и их распределение между органами и тканями контролируются функциональной активностью как донорных, так и акцепторных органов, причем наиболее эффективно — при одновременном

участии этих двух элементов донорно-акцепторной системы [58]. В условиях CL доноры обеспечивают непрерывное поступление сахаров. Очевидно, что при этом не происходит пропорционального увеличения запроса со стороны акцепторов [59] и/или способности экспортировать сахарозу [3, 45], поэтому возникающий избыток сахаров не может быть экспортирован и остается в листьях. Так, снижение запроса со стороны акцептора вследствие уменьшения плодонагрузки у растений томата и перца (только один плод в кисти) не сказывалось на накоплении крахмала и сахаров при 14- и 24-часовом фотопериодах и не увеличило степень повреждения, вызванного CL [18, 36]. Следовательно, лимитирующим фактором может выступать неспособность листа экспортировать фотоассимиляты. Имеются также данные, что неспособность экспортировать продукты распада крахмала может вызывать хлороз и деградацию хлоропластов у арабидопсиса [60]. Сходным образом мутанты *tie-dyed1* кукурузы, которые неспособны экспортировать углеводы наравне с немутантными растениями, демонстрировали сильный светозависимый хлороз, предположительно связанный с накоплением углеводов [61–63]. Было также показано, что высокий запрос со стороны акцептора может, наоборот, снижать повреждение. При выращивании в условиях CL двух видов лука, у вида *Allium cepa* L., который формировал луковицу, не наблюдалось ингибирование фотосинтеза, в то время как у неформирующей луковицы *A. fistulosum* L. отмечено снижение скорости фотосинтеза [59]. Сходные результаты были получены на картофеле [64]. В обоих случаях хороший рост в условиях CL был связан с высоким запросом акцептора, т.е. у луковиц и клубней. Таким образом, имеются данные, свидетельствующие о том, что повреждения, вызванные CL, положительно коррелируют с гипераккумуляцией углеводов и отрицательно с аттрагирующей активностью акцептора.

У томата помимо повышения содержания крахмала и растворимых сахаров и развития хлороза CL вызывало снижение скорости фотосинтеза и активности фермента сахарозофосфатсинтазы [65]. Этот фермент является ключевым в синтезе сахарозы (главного экспортируемого сахара) и может влиять на распределение углеводов. Например, показано, что у трансгенных растений томата со сверхэкспрессией сахарозофосфатсинтазы, было снижено содержание крахмала, увеличено содержание сахарозы и скорости фотосинтеза по сравнению с обычными растениями [66–68]. На основании этого высказано предположение, что накопление крахмала и сахаров в условиях CL может быть вызвано ограниченным синтезом сахарозы вследствие снижения активности данного фермента. Однако изменение его активности происходило на 6–8 нед. воздействия CL на растения, то есть примерно тогда, когда развивался хлороз листьев,

а содержание крахмала и гексоз в листьях увеличилось значительно раньше (в первые 4 нед. эксперимента). Очевидно, что снижение активности фермента произошло после увеличения содержания крахмала и гексоз, поэтому трудно предполагать, что именно он ответственен за их накопление. Тем не менее, возможно, что активность сахарозофосфатсинтазы *in vivo* лимитирована, что может объяснить накопление гексоз. Это предполагает, что лимитирующим этапом экспорта фотоассимилятов у томата является синтез сахарозы и это объясняет отсутствие роста и увеличения продуктивности в условиях CL. Кроме того, повышенный уровень гексоз в цитоплазме по принципу обратной связи ограничивает экспорт триозофосфатов (промежуточных продуктов фотосинтеза) из хлоропластов, которые затем перенаправляются на синтез крахмала, обеспечивая увеличение его содержания в пластидах [3]. Более того, накопление крахмала “перегружает” цикл Кальвина, вызывая постепенное снижение ассимиляции CO<sub>2</sub>. Возможно, что подобная “перегрузка” цикла Кальвина может уменьшать использование АТФ и НАДФН, образованных в световой фазе фотосинтеза, вызывая тем самым “перегрузку” ЭТЦ хлоропластов, фотоокисление хлорофилла и снижение его содержания, объясняя таким образом наблюдаемый хлороз листьев [3]. На основании этих исследований был сделан вывод, что в негативных эффектах длинных фотопериодов на растения томата определенную роль может играть углеводный обмен. У растений перца в тех же условиях влияние фотопериода на углеводный обмен не наблюдалось и это может объяснять их большую, чем томатов, устойчивость к CL [48].

В одной из недавних работ показана возможность выращивания растений огурца (сорт *Wopwell RZ F1 mini*) в течение всего продукционного цикла с использованием дополнительного освещения светодиодными лампами, обеспечивающего 24-часовой фотопериод [69]. В отсутствие хлороза урожаи растений, выращенных в условиях CL, был сходен с контролем, но экономически такой режим был более выгодным, т.к. позволил сократить не только начальные затраты на осветительные приборы, но и операционные затраты за счет перераспределения освещения на ночное время, когда стоимость электроэнергии ниже благодаря ночным тарифам. В отличие от огурца, в таких же условиях у растений томата развивался хлороз листьев. Авторы подчеркивают, что эти две важные тепличных культуры (томат и огурец) по-разному реагируют на схожие световые условия, что возможно связано с различиями в их углеводном обмене, а именно в процессе экспорта углевода. У томата основным транспортным углеводом является сахароза, а у огурца – раффиноза и стахиоза [70, 71]. Кроме того, у томатов работает механизм апопластной загрузки флоэмы, в то время

как у огурца происходит симпластная загрузка. Эти два механизма существенно отличаются, причем апопластная загрузка флоэмы представляет собой более сложный путь с участием ферментов и транспортеров, являющихся потенциальными пунктами регуляции [70, 72], а симпластная загрузка флоэмы более “рудиментарна” с минимальным уровнем регуляции [71]. Благодаря разнице в способе загрузки флоэмы и образованию раффинозы и стахиозы огурец отличается быстрым экспортом недавно связанного углерода, сводя тем самым к минимуму накопление углеводов (крахмала) в листьях [73]. Следовательно, при обсуждении избыточного накопления углеводов в листьях в условиях CL и его потенциальных последствий нельзя упускать из виду скорость оттока сахаров из листьев. Предполагается, что у огурца избыточное накопление сахаров проявляется в меньшей степени, чем у томата, именно благодаря высокой скорости экспорта, что делает огурец более устойчивым к CL [69].

Интересная серия опытов для проверки обсуждаемой гипотезы была проведена на растениях баклажана, которые выращивали при CL, но лишая их CO<sub>2</sub> в атмосфере на 6 или 12 ч ежедневно [32]. В отсутствие CO<sub>2</sub> в атмосфере в течение 12 ч, крахмала и гексоз накапливалось меньше, чем при постоянном присутствии CO<sub>2</sub> и хлороз листьев не развивался. Содержание крахмала и сахарозы в варианте с 6-часовым отсутствием CO<sub>2</sub> было промежуточным и хлороз развивался на 4 дня позже, чем у растений, не испытывавших дефицита CO<sub>2</sub>. Уменьшение времени снабжения CO<sub>2</sub> привело к снижению фотосинтетической активности листьев, несмотря на то что уровень освещенности был постоянным. В этой ситуации накопление крахмала в хлоропластах до критического уровня заняло больше времени. В результате опытов был сделан вывод, что дестабилизация углеводного обмена и последующее накопление фотоассимилятов в листьях, в частности крахмала, может играть основную роль в развитии хлороза при длинных фотопериодах [32].

Помимо прочего, накопление углеводов в условиях CL может вызывать нарушения и повреждения в растениях вследствие усиления генерации АФК [5]. В разных условиях накопление углеводов ассоциируется с подавлением фотосинтеза, в том числе при длительной экспозиции при высокой концентрации CO<sub>2</sub> [74], дефиците магния [75], сахарной подкормке [76] и мутациях, влияющих на обмен углеводов [62, 63]. Фотосинтетическая регуляция, включающая подавление фотосинтеза и ретроградный сигнальный путь — это ряд краткосрочных и долгосрочных адаптационных изменений, которые оказывают на фотосинтез регулирующее воздействие таким образом, что образование АТФ и НАДФН в световых реакциях сбалансиро-

вано со скоростью их утилизации, предотвращая сверхвосстановление компонентов хлоропластной ЭТЦ [77]. Накопление углеводов, вызванное CL, ведет к чрезмерному восстановлению акцепторов электронов, в результате чего фотосинтетическая ЭТЦ передает электроны на молекулярный кислород, генерируя АФК, вызывающие окислительное повреждение [5, 75]. С другой стороны, растворимые сахара, такие как сахароза, глюкоза и фруктоза, когда они присутствуют в более высокой концентрации, могут нейтрализовать АФК и предотвращать фотоповреждения за счет снижения окислительного пентозофосфатного пути и усиления биосинтеза аскорбиновой кислоты и каротиноидов [78].

Ретроградные сигналы (от пластид к ядру) оказывают регулирующее воздействие на экспрессию генов *PhANGs* (*photosynthesis-associated nuclear genes*), направленное на согласование потребностей и состояния хлоропластов [79, 80]. Недавние исследования показывают, что ретроградный сигнальный путь пересекается с сетью светового сигналинга [81–83]. Например, на дисфункциональных хлоропластах показано, что пластидный сигнал может перенаправить световой сигнал так, что вместо индукции экспрессии происходит репрессия некоторых генов, ассоциированных с фотосинтезом. Отчасти это может объяснять влияние спектрального состава света [3, 7, 16, 33, 84, 85] на степень повреждений, вызванных CL.

Таким образом, логично предположить, что CL изменяет редокс-состояние компонентов ЭТЦ хлоропластов, как следствие накопления углеводов и сверхвосстановления акцепторов электронов, приводя к подавлению фотосинтеза и развитию фотоповреждений листьев [20]. В подтверждение развития окислительного стресса у растений в условиях CL в ряде работ был показан более высокий уровень активности антиоксидантных ферментов при выращивании растений в условиях 24-часового фотопериода по сравнению с обычными фотопериодами [24, 34, 86].

Еще один возможный путь влияния избытка крахмала на фотоповреждения растений связан с тем, что на углеводный обмен оказывает влияние циркадная ритмика [87–89]. Высказано предположение, что у растений, выращиваемых в условиях CL, непрерывное поступление сахарозы может нарушать синхронизацию циркадных ритмов побегов и корней [90].

#### ДАННЫЕ, НЕ ПОДДЕРЖИВАЮЩИЕ ГИПОТЕЗУ О ГИПЕРАККУМУЛЯЦИИ КРАХМАЛА КАК ОСНОВНОЙ ПРИЧИНЕ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ ЛИСТЬЕВ

В предыдущем разделе приведены примеры работ, в которых появление хлороза, по мнению



авторов, прямо или косвенно было обусловлено избыточным накоплением крахмала и/или других углеводов. Однако, анализ литературы показывает, что точно также имеется значительное количество работ, результаты которых позволяют высказывать гипотезы, отводящие накоплению углеводов второстепенную роль в развитии хлороза в условиях длинных фотопериодов или даже вообще отрицающие их участие. Так, например, у растений огурца в условиях СЛ признаки хлороза отмечались через 4 нед., а через 5 нед. наблюдался сильный хлороз и некроз листьев [38]. Однако содержание крахмала в пробах, взятых через 4 и 5 нед. СЛ было даже ниже, чем в листьях растений, выращиваемых при 18-часовом фотопериоде. Эти данные не поддерживают гипотезу о гипераккумуляции углеводов как причине развития хлороза, но сами авторы не исключают, что это может быть связано с тем, что пробы были взяты на довольно поздних стадиях развития повреждений, а содержание углеводов до появления хлороза не анализировалось.

В листьях картофеля ассимиляция  $\text{CO}_2$  и содержание крахмала сильно снижались после появления повреждений, вызванных СЛ [42]. Отмечено, что в первые 5 сут в условиях СЛ при постоянной температуре сохранялась нормальная структура хлоропластов, способность к фотосинтезу и синтезу крахмала, но затем большие участки листьев резко теряли способность к ассимиляции  $\text{CO}_2$ , поддержанию резервов крахмала и сохранению целостности мембран хлоропластов [43]. При этом структура хлоропластов в отдельных участках листа заметно деградировала до появления видимых признаков повреждения. Кроме того, было показано [42, 43], что снижение ассимиляции  $\text{CO}_2$  листьями картофеля не было связано с ограничениями со стороны устьиц. Следовательно, ассимиляция  $\text{CO}_2$  могла снижаться вследствие того, что большие участки листьев утрачивали способность к фотосинтезу, а не из-за ограниченного газообмена. Уменьшение ассимиляции  $\text{CO}_2$ , содержания крахмала и нарушение целостности мембран хлоропластов, проявившиеся на 6 или 7 сут, были самыми ранними событиями, четко ассоциированными с появлением повреждений. Интересно, что полная потеря функций хлоропластов на большой площади листа картофеля никак не отразилась на процессе роста листа. В условиях СЛ у поврежденных листьев увеличение площади происходило с такой же скоростью и до такого же размера, как у неповрежденных листьев [42].

Изучение чувствительных и устойчивых к СЛ сортов картофеля показало, что у чувствительных сортов скорость фотосинтеза и биомасса растений в условиях СЛ были значительно ниже, чем у устойчивых сортов, но при этом концентрация крахмала у них была в 10 раз меньше [42]. Однако,

по концентрации растворимых сахаров две группы сортов не различались. Эти результаты показывают, что более низкая скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$  и торможение роста у чувствительных сортов не связаны с избыточным накоплением углеводов в листьях.

В серии работ на томате авторы [24, 25] наблюдали нарушение суточной динамики содержания углеводов в условиях СЛ. При 24-часовом фотопериоде уровень содержания сахаров практически не менялся в суточном цикле из-за непрерывного поступления фотоассимилятов, что может быть связано с ингибированием под влиянием света активности ферментов, расщепляющих углеводы [91]. Однако гипераккумуляции углеводов при этом не происходило, что позволило предположить, что снижение скорости фотосинтеза и повреждение листьев при СЛ не были связаны с накоплением углеводов. Снижение скорости фотосинтеза у растений томата в условиях СЛ при постоянной температуре было вызвано не закрытием устьиц и накоплением углеводов, а уменьшением карбоксилирования и регенерации РБФК/О [25]. Выращивание томата в условиях СЛ с применением переменных температур дня и ночи (термопериода) с градиентом  $10^\circ\text{C}$  значительно снижало степень повреждения листьев, однако содержание углеводов в них было сопоставимо или даже выше, чем у растений, выращенных при постоянной температуре, у которых развивался сильный хлороз [25].

В работах с использованием монохроматического света было показано, что СЛ синим светом приводило к развитию сильного хлороза листьев томата [92]. При этом содержание крахмала и растворимых сахаров в листьях этих растений было ниже, чем у растений с более слабой степенью хлороза (при облучении монохроматическим красным светом или красно-синими светодиодами лампами). В серии опытов с использованием монохроматического света разных спектров и разных соотношений (1 : 1, 1 : 3) красного и синего спектров линейный регрессионный анализ между такими показателями как доля площади хлоротичных участков листьев и содержанием крахмала и растворимых сахаров через 14 дней действия СЛ показал отсутствие корреляции, указывая на то, что разная степень хлороза не объясняется различиями в содержании углеводов. При этом была выявлена высокая корреляция (коэффициенты детерминации 0.88–0.95) между содержанием глюкозы и фруктозы и степенью эпинастии листьев. На основании полученных данных, авторы [92] пришли к заключению, что хлороз листьев и эпинастии, возникающие в условиях СЛ являются двумя типами ответных реакций растений, не связанными друг с другом и управляемыми разными механизмами. Кроме того, в этих работах [25, 92] было показано, что степень хлороза



**Рис. 2.** Растение баклажана, выращенное в течение 3 недель при 16-часовом фотопериоде и затем в течение 4 недель в условиях 24-часового фотопериода и постоянной температуры 23°C.

листьев не коррелирует с содержанием  $H_2O_2$  и скоростью генерации  $O_2^{\cdot -}$ , что в противоположность ранее высказанным предположениям исключает их непосредственное участие в развитии фотоповреждений листьев.

Надо отметить, что в работах, подтверждающих гипотезу о гипераккумуляции крахмала как причине фотоповреждений листьев у чувствительных видов [11, 15, 18, 32], поддержание одинакового уровня освещенности в вариантах опытов с разной продолжительностью фотопериода привело к различиям в интеграле дневного освещения (ИДО) (ИДО = фотопериод · ФАР). Растения, выращенные в условиях СЛ, суммарно получали больше света в день, что могло увеличить скорость фотосинтеза и привести к большому накоплению углеводов в листьях по сравнению с растениями, получающими меньший ИДО. В работах на томате [24, 46], огурце [38] и картофеле [42], где ключевая роль углеводов в развитии фотоповреждений поставлена под вопрос, сохранялся один и тот же ИДО за счет использования разных уровней освещенности в вариантах опыта с разными фотопериодами. Возможно, различия в постановке экспериментов могут частично объяснить несовпадение результатов и выводов. В наших экспериментах было показано [31], что при разном ИДО растения томата и огурца в условиях 24-часового фотопериода имели значения сухой массы листа на единицу площади (LMA, от англ. *Leaf Mass per Area*) на 31 и 14% выше, чем при 14-часовом фотопериоде, соответственно. При этом содержание хлорофилла снижалось на 38 и 24% и наблюдался хлороз листьев. В опытах, ко-

гда ИДО был одинаковым, у томата значения LMA в условиях СЛ были ниже на 25% по сравнению с 14 ч фотопериодом, а у огурца не изменялись. При этом также наблюдался хлороз и содержание хлорофилла при СЛ было ниже на 27% у обоих видов. Следовательно, деградация хлорофилла и развитие хлороза листьев происходили независимо от накопления углеводов в листьях, о чем можно косвенно судить по значениям LMA. В серии экспериментов со взрослыми растениями томата и баклажана мы имели возможность измерить LMA у хлоротичных и зеленых (без признаков хлороза) листьев, находящихся в условиях СЛ [30]. Наличие зеленых листьев связано с существованием возрастной изменчивости в чувствительности растений к СЛ. Взрослые растения становятся менее чувствительными и хлороз листьев не развивается (рис. 2). Значения LMA у хлоротичных листьев были на 45 и 12% выше у томата и баклажана по сравнению с 16-часовым фотопериодом (при разном ИДО). Содержание хлорофилла при этом было на 30 и 23% ниже, соответственно. В этих же условиях у зеленых листьев томата и баклажана значения LMA были в 2 и 1.5 раза, соответственно, выше таковых при 16-часовом фотопериоде. Содержание хлорофилла было ниже на 19 и 15% у томата и баклажана, но признаков хлороза и некроза не наблюдалось. Таким образом, и в этих опытах не наблюдалось связи между накоплением углеводов в листьях и развитием фотоповреждений.

Исследования с использованием молекулярно-биологических методов показали, что устойчивость к СЛ у дикого томата обусловлена геном

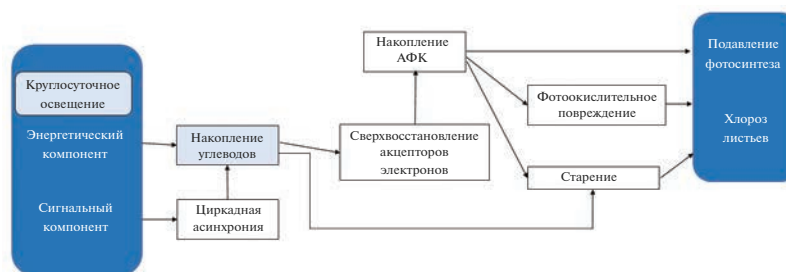


Рис. 3. Предполагаемые механизмы, обуславливающие подавление фотосинтеза и повреждение листьев растений в условиях круглосуточного освещения (по Velez-Ramirez et al., 2011, с модификациями).

*LHCB type III CAB-13*, связь которого с углеводным обменом не установлена [19]. Этот ген кодирует белок светособирающего комплекса ФС I.

Вместо подавления процесса фотосинтеза по принципу обратной связи у растений, выращиваемых в условиях CL, высокая концентрация сахаров может быть триггером старения [5]. Было высказано предположение, что повреждения, вызванные CL, имеют признаки ускоренного старения [17, 43]. CL вызывает повышение концентрации сахаров и этилена — потенциальных триггеров старения листьев [93, 94]. Однако заметим, что гипотеза, предполагающая, что высокие концентрации сахаров запускают старение листьев, противоречива. В обзоре [95] рассмотрены две гипотезы: первая о том, что программируемая клеточная гибель может быть вызвана углеводным голоданием листьев и, вторая — накоплением углеводов в клетках листьев. Но ни одна из них не нашла достаточного экспериментального подтверждения [5].

Развитие симптомов повреждений при CL в листьях чувствительных сортов картофеля действительно напоминает процесс старения, когда основные белковые и углеводные компоненты листа деградируют и продукты их распада перемещаются в другие части растения [96]. Возможно, что симптомы повреждений, вызванных CL, сходны с другими похожими на старение событиями, особенно теми, которые индуцированы разными видами стресса, поскольку хорошо известно, что стресс может привести к быстрой утрате фотосинтетической способности, потере содержания крахмала, появлению некроза и старению тканей листа. Нельзя также исключить, что все симптомы повреждений, описываемые при действии на растения CL на самом деле носят вторичный характер и обусловлены каким-то пока не установленным первичным событием.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях CL растения попадают в ситуацию, с которой они не встречаются в природных условиях. В противоположность естественному фото-

периоду, включающему чередование дня и ночи в суточном цикле, CL обеспечивает непрерывное поступление световой энергии, необходимой для фотосинтеза, вызывает постоянное фотоокислительное воздействие и постоянное сигнальное воздействие на фоторецепторы (если в какой-то момент не произойдет их десенситизация), а также может приводить к рассогласованию внутренних (циркадных) биоритмов с внешним циклом свет/темнота (циркадная асинхрония) (рис. 3). Поскольку влияние энергетического и сигнального компонентов CL на растения происходит одновременно, то однозначно определить какой из них является первопричиной повреждения листьев, затруднительно. Энергетический компонент может вызывать повреждения, приводя к углеродному дисбалансу и в результате фотоокислению. Сигнальный компонент также может играть важную роль в развитии повреждений, на что указывает тот факт, что при выращивании растений в условиях термопериода (переменных суточных температур) у чувствительных растений степень хлороза намного ниже или он не развивается вообще [3, 4, 25, 26, 33, 43, 97–99]. Участие циркадной асинхронии в развитии фотоповреждений листьев под влиянием CL также находит в последние годы все новые подтверждения [5, 20]. Наконец, не исключено, что хлороз, наблюдаемый в условиях CL у некоторых чувствительных к избыточному свету видов растений, может быть проявлением супрессированной светозависимой хлорофиллдефектности [28].

В целом, анализ имеющихся литературных и собственных данных приводит нас к выводу, что поскольку влияние разных компонентов (составляющих) CL на растения происходит одновременно, то наиболее вероятно, что все они участвуют в той или иной степени в фотоповреждении листьев. Хотя в каждой конкретной ситуации удельный вклад любого из них может существенно варьировать, в зависимости от биологических особенностей объекта (вида, сорта, генотипа) и/или от условий внешней среды. Поэтому накопление углеводов не может, на наш взгляд, рассматриваться в качестве главной и тем более единственной причи-

ны повреждения листьев растений в условиях СЛ и длинных фотопериодов. Но и исключать роль этого фактора в появлении и развитии фотоповреждений листьев тоже нельзя.

Следовательно, установление причин, определяющих появление и развитие повреждений листьев у растений в условиях СЛ является сложной и многоплановой задачей, требующей продолжения исследований. Очевидно, что ее решение будет иметь не только важное фундаментальное, но и прикладное значение, т.к. понимание биологической природы данного феномена получит свое отражение в сельскохозяйственной и растениеводческой практике, в частности, при выращивании в условиях контролируемой внешней среды овощных, цветочных и декоративных растений, масштабы производства которых во всем мире постоянно растут.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-016-00033а. Работа выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук” в рамках государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-004).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Demmig-Adams B., Adams W.W.* Photoprotection and other responses of plants to high light stress // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1992. V. 43. P. 599. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.003123>
2. *Li Z., Wakao S., Fischer B.B., Niyogi K.K.* Sensing and responding to excess light // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2009. V. 60. P. 239. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844>
3. *Demers D.A., Gosselin A.* Growing greenhouse tomato and sweet pepper under supplemental lighting: optimal photoperiod, negative effects of long photoperiod and their causes // *Acta Hort.* 2002. V. 580. P. 83. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.580.9>
4. *Sysoeva M.I., Markovskaya E.F., Shibaeva T.G.* Plant under continuous light: a review // *Plant Stress.* 2010. V. 4. P. 5.
5. *Velez-Ramirez A.I., van Ieperen W., Vreugdenhil D., Millenaar F.F.* Plants under continuous light // *Trends Plant Sci.* 2011. V. 16. P. 310. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.003>
6. *Arthur J.M.* Plant growth in continuous illumination // *Biological effects of radiation.* V. 2 / Ed. B.M. Duggar. New York: McGraw-Hill Book Company. 1936. P. 715.
7. *Arthur J.W., Guthrie J.D., Newell J.M.* Some effects of artificial climates on the growth and chemical composition of plants // *Amer. J. Bot.* 1930. V. 17. P. 416. <https://doi.org/10.2307/2435930>
8. *Withrow A.P., Withrow R.B.* Photoperiodic chlorosis in tomato // *Plant Physiol.* 1949. V. 24. P. 657. <https://doi.org/10.1104/pp.24.4.657>
9. *Hillman W.S.* Injury of tomato plants by continuous light and unfavorable photoperiodic cycles // *Amer. J. Bot.* 1956. V. 43. P. 89. <https://doi.org/10.2307/2438816>
10. *Ho L.C.* The relationship between rates of carbon transport and of photosynthesis in tomato leaves // *J. Exp. Bot.* 1976. V. 27. P. 87. <https://doi.org/10.1093/jxb/27.1.87>
11. *Bradley F.M., Janes H.W.* Carbon partitioning in tomato leaves exposed to continuous light // *Acta Hort.* 1985. V. 174. P. 293. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.174.37>
12. *Logendra S., Putman J.D., Janes H.W.* The influence of light period on carbon partitioning, translocation and growth in tomato // *Sci. Hort.* 1990. V. 42. P. 75. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(90\)90149-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(90)90149-9)
13. *Vézina F., Trudel M.J., Gosselin A.* Influence du mode d'utilisation de l'éclairage d'appoint sur la productivité et la physiologie de la tomate se serre // *Can. J. Plant Sci.* 1991. V. 71. P. 923.
14. *Dorais M., Carpentier R., Yelle S., Gosselin A.* Adaptability of tomato and pepper leaves to changes in photoperiod: effects on the composition and function of the thylakoid membrane // *Physiol. Plant.* 1995. V. 94. P. 692. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00986.x>
15. *Dorais M., Yelle S., Gosselin A.* Influence of extended photoperiod on photosynthate partitioning and export in tomato and pepper plants // *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 1996. V. 24. P. 29. <https://doi.org/10.1080/01140671.1996.9513932>
16. *Globig S., Rosen I., Janes H.W.* Continuous light effects on photosynthesis and carbon metabolism in tomato // *Acta Hort.* 1997. V. 418. P. 141. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.418.19>
17. *Cushman K.E., Tibbitts T.W.* The role of ethylene in the development of constant-light injury of potato and tomato // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1998. V. 123. P. 239.
18. *Demers D.A., Dorais M., Wien H.C., Gosselin A.* Effects of supplemental light duration on greenhouse tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and fruit yields // *Sci. Hort.* 1998. V. 74. P. 295. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00097-1)
19. *Velez-Ramirez A.I., van Ieperen W., Vreugdenhil D., van Poppel P.M.J.A., Heuvelink E., Millenaar F.F.* A single locus confers tolerance to continuous light and allows substantial yield increase in tomato // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4549. <https://doi.org/10.1038/ncomms5549>
20. *Velez-Ramirez A.I., Dünner-Planella G., Vreugdenhil D., Millenaar F.F., van Ieperen W.* On the induction of injury

- in tomato under continuous light: circadian asynchrony as the main triggering factor // *Funct. Plant Biol.* 2017. V. 6. P. 597.  
<https://doi.org/10.1071/FP16285>
21. *Velez-Ramirez A., Carreno-Quintero N., Vreugdenhil D., Millenaar F.F., van Ieperen W.* Sucrose and starch content negatively correlates with PSII maximum quantum efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*) exposed to abnormal light/dark cycles and continuous light // *Plant Cell Physiol.* 2017. V. 58. P. 1339.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx068>
  22. *Matsuda R., Ozawa N., Fujiwara K.* Effects of continuous lighting with or without a diurnal temperature difference on photosynthetic characteristics of tomato leaves // *Acta Hort.* 2012. V. 956. P. 165.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.956.16>
  23. *Matsuda R., Yamano T., Murakami K., Fujiwara K.* Effects of spectral distribution and photosynthetic photon flux density for overnight LED light irradiation on tomato seedling growth and leaf injury // *Sci. Hort.* 2016. V. 198. P. 363.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.045>
  24. *Hague M.S., Kjaer K.H., Rosenqvist E., Ottosen C.O.* Continuous light increases growth, daily carbon gain, antioxidants, and alters carbohydrate metabolism in a cultivated and a wild tomato species // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 522.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00522>
  25. *Hague M., de Sousa A., Soares C., Kjaer K.H., Fidalgo F., Rosenqvist E., Ottosen C.-O.* Temperature variation under continuous light restores tomato leaf photosynthesis and maintains the diurnal pattern in stomatal conductance // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1602.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01602>
  26. *Ikkonen E.N., Shibaeva T.G., Rosenqvist E., Ottosen C.O.* Daily temperature drop prevents inhibition of photosynthesis in tomato plants under continuous light // *Photosynthetica.* 2015. V. 53. P. 114.  
<https://doi.org/10.1007/s11099-015-0115-4>
  27. *Shibaeva T.G., Sherudilo E.G.* Immediate and delayed effects of diurnal temperature drops on growth and reproductive development of tomato plants grown under continuous lighting // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 328.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443715030176>
  28. *Шибеева Т.Г., Титов А.Ф.* Влияние круглосуточного освещения на пигментный комплекс растений сем. *Solanaceae* // Труды Карельского научного центра РАН. Серия Экспериментальная биология. 2017. № 5. С. 111.  
<https://doi.org/10.17076/eb498>
  29. *Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Sherudilo E.G.* Evaluation of a SPAD-502 plus chlorophyll meter to estimate chlorophyll content in leaves with interveinal chlorosis // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 690.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443720040160>
  30. *Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Sherudilo E.G., Ikkonen E.N., Titov A.F.* Age-related changes in sensitivity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaves to continuous light // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 948.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443721040154>
  31. *Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Sherudilo E.G., Titov A.F.* The role of photosynthetic daily light integral in plant response to extended photoperiods // *Russ. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 7.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443722010216>
  32. *Murage E., Watashiro N., Masuda M.* Leaf chlorosis and carbon metabolism of eggplant in response to continuous light and carbon dioxide // *Sci. Hort.* 1996. V. 67. P. 27.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00930-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00930-2)
  33. *Murage E.N., Sato Y., Masuda M.* Influence of light quality, PPFD and temperature on leaf chlorosis of eggplants grown under continuous illumination // *Sci. Hort.* 1997. V. 68. P. 73. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00953-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00953-3)
  34. *Murage E.N., Masuda M.* Response of pepper and eggplant to continuous light in relation to leaf chlorosis and activities of antioxidative enzymes // *Sci. Hort.* 1997. V. 70. P. 269.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00078-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00078-2)
  35. *Nilwik H.J.M.* Growth analysis of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Interacting effects of irradiance, temperature and plant age in controlled conditions // *Ann. Bot.* V. 48. P. 137.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086107>
  36. *Demers D.A., Gosselin A., Wien H.C.* Effects of supplemental light duration on greenhouse sweet pepper plants and fruit yields // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1998. V. 123. P. 202.  
<https://doi.org/10.21273/JASHS.123.2.202>
  37. *Lanoue J., Little C., Hao X.* The power of far-red light at night: photomorphogenic, physiological, and yield response in pepper during dynamic 24 hour lighting // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 857616.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.857616>
  38. *Wolff S.A., Langerud A.* Fruit yield, starch content and leaf chlorosis in cucumber exposed to continuous lighting // *Eur. J. Hort. Sci.* 2006. V. 71. P. 259.
  39. *Shibaeva T.G., Markovskaya E.F.* Growth and development of cucumber *Cucumis sativus* L. in the prereproductive period under long photoperiods // *Russ. J. Dev. Biol.* 2013. V. 44. P. 78.  
<https://doi.org/10.1134/S1062360413020082>
  40. *Wheeler R.M., Tibbitts T.W.* Utilization of potatoes for life support systems in space. I. Cultivar-photoperiod interaction // *Am. Potato J.* 1986. V. 63. P. 315.  
<https://doi.org/10.1007/BF02854441>
  41. *Wheeler R.M., Tibbitts T.W.* Growth and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) under continuous light // *Plant Physiol.* 1986. V. 80. P. 801.  
<https://doi.org/10.1104/pp.80.3.801>
  42. *Cao W., Tibbitts T.W.* Physiological responses in potato plants under continuous irradiation // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1991. V. 116. P. 525.  
<https://doi.org/10.21273/JASHS.116.3.525>

43. *Cushman K.E., Tibbitts T.W., Sharkey T.D., Wise R.R.* Constant-light injury of potato: temporal and spatial patterns of carbon dioxide assimilation, starch content, chloroplast Integrity, and necrotic lesions // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1995. V. 120. P. 1032.  
<https://doi.org/10.21273/JASHS.120.6.1032>
44. *Wheeler R.M.* Potato and human exploration of space: some observations from NASA-sponsored controlled environment studies // *Potato Res.* 2006. V. 49. P. 67.  
<https://doi.org/10.1007/s11540-006-9003-4>
45. *Dorais M., Gosselin A.* Physiological response of greenhouse vegetable crops to supplemental lighting // *Acta Hort.* 2002. V. 580. P. 59.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.580.6>
46. *Matsuda R., Ozawa N., Fujiwara K.* Leaf photosynthesis, plant growth, and carbohydrate accumulation of tomato under different photoperiods and diurnal temperature differences // *Sci. Hort.* 2014. V. 170. P. 150.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.014>
47. *Dorais M.* Aspects culturaux et physiologiques de la tomate et du poivron de serre soumis à un éclairage d'appoint. Thèse de doctorat faculté des études supérieures. Université Laval, Québec, Canada. 1992.
48. *Demers D.A., Yelle S., Gosselin A.* Effects of continuous lighting on enzyme activities of leaf carbon metabolism of tomato and pepper plants // *Hort. Sci.* 1994. V. 29. P. 250.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.29.4.250a>
49. *Sawada S., Hayakawa T., Fukushi K., Kasai M.* Influence of carbohydrates on photosynthesis in single rooted soybean leaves used as a source-sink model // *Plant Cell Physiol.* 1986. V. 27. P. 591.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077138>
50. *Kerr P.S., Ruffy T.W., Huber S.C.* Endogenous rhythms in photosynthesis, sucrose phosphate synthase activity, and stomata resistance in leaves of soybeans (*Glycine max* L. Merr.) // *Plant Physiol.* 1985. V. 77. P. 275.  
<https://doi.org/10.1104/pp.77.2.275>
51. *Layne D.R., Flore J.A.* Physiological responses of *Prunus cerasus* to whole-plant source manipulation. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations and carbohydrate concentrations // *Physiol. Plant.* 1993. V. 88. P. 44.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01758.x>
52. *Kalucheva I., Vinarova K.* Deformation of chloroplasts upon illumination and darkening of tomato leaves // *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 1969. V. 22. P. 93.
53. *Schaffer A.A., Nerson H., Zamski E.* Premature leaf chlorosis in cucumber associated with high starch accumulation // *J. Plant Physiol.* 1991. V. 138. P. 186.  
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80268-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80268-3)
54. *Chatterton N.J., Silvius J.E.* Photosynthate partitioning into starch in soybean leaves. 1. Effects of photoperiod versus photosynthetic period duration // *Plant Physiol.* 1979. V. 64. P. 749.
55. *Chatterton N.J., Silvius J.E.* Photosynthate partitioning into leaf starch as affected by the daily photosynthetic period duration in six species // *Physiol. Plant.* 1980. V. 49. P. 141.
56. *Курсанов А.Л.* Эндогенная регуляция транспорта ассимилятов и донорно-акцепторные отношения у растений // *Физиология растений.* 1984. Т. 31. С. 579.
57. *Курсанов А.Л.* Эндогенная регуляция транспорта ассимилятов и донор-акцепторные отношения у растений // *Передвижение ассимилятов в растениях и проблема сахаронакопления* / Под ред. В.А. Печенова. Фрунзе: Илим, 1986. С. 110.
58. *Мокроносов А.Т.* Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. М.: Наука, 1983. 64 с.
59. *Van Gestel N.C., Nesbit A.D., Gordon E.P., Green C., Pare P.W., Thompson L., Peffley E.B., Tissue D.T.* Continuous light may induce photosynthetic downregulation in onion – consequences for growth and biomass partitioning // *Physiol. Plant.* 2005. V. 125. P. 235.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00560.x>
60. *Stettler M., Eicke S., Mettler T., Messerli G., Hörtensteiner S., Zeeman S.C.* Blocking the metabolism of starch breakdown products in *Arabidopsis* leaves triggers chloroplast degradation // *Mol. Plant.* 2009. V. 2. P. 1233.  
<https://doi.org/10.1093/mp/ssp093>
61. *Braun D.M., Ma Y., Inada N., Muszynski M.G., Baker R.F.* Tie-dyed1 regulates carbohydrate accumulation in maize leaves // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 1511.  
<https://doi.org/10.1104/pp.106.090381>
62. *Baker R.F., Braun D.M.* Tie-dyed1 functions non-cell autonomously to control carbohydrate accumulation in maize leaves // *Plant Physiol.* 2007. V. 144. P. 867.  
<https://doi.org/10.1104/pp.107.098814>
63. *Baker R.F., Braun D.M.* Tie-dyed2 functions with Tie-dyed1 to promote carbohydrate export from maize leaves // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. P. 1085.  
<https://doi.org/10.1104/pp.107.111476>
64. *Cushman K.E., Tibbitts T.W.* Size of tuber propagule influences injury of “Kennebec” potato plants by constant light // *Hort. Sci.* 1996. V. 31. P. 1164.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.7.1164>
65. *Demers D.A.* Physiologie, photosynthèse et métabolisme carboné de plants de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) et de poivron (*Capsicum annum* L.) cultivés sous de longues photoperiods. Thèse de Doctorat, Faculté des Études Supérieures, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. 1998.
66. *Galtier N., Foyer C.H., Huber J., Voelker T.A., Huber S.C.* Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis and assimilate partitioning and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var UC82B) // *Plant Physiol.* 1993. V. 101. P. 535.  
<https://doi.org/10.1104/pp.101.2.535>
67. *Galtier N., Foyer C.N., Murchie E., Alred R., Quick P., Voelker T.A., Thépenier C., Lascève G., Betsche T.* Effects of light and atmospheric carbon dioxide enrichment on photosynthesis and carbon partitioning in the

- leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants over-expressing sucrose phosphate synthase // *J. Exp. Bot.* 1995. V. 46. P. 1335.  
[https://doi.org/10.1093/jxb/46.special\\_issue.1335](https://doi.org/10.1093/jxb/46.special_issue.1335)
68. Micallef B.J., Haskins K.A., Vanderveer P.J., Roh K.S., Shewmaker C.K., Sharkey T.D. Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have increased capacity for sucrose synthesis // *Planta.* 1995. V. 196. P. 327.  
<https://doi.org/10.1007/BF00201392>
  69. Lanoue J., Zheng J., Little C., Grodzinski B., Hao X. Continuous light does not compromise growth and yield in mini-cucumber greenhouse production with supplemental led light // *Plants.* 2021. V. 10. P. 378.  
<https://doi.org/10.3390/plants10020378>
  70. Lanoue J., Leonardos E.D., Grodzinski B. Effects of light quality and intensity on diurnal patterns and rates of photo-assimilate translocation and transpiration in tomato leaves // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 756.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00756>
  71. Ma S., Sun L., Sui X., Li Y., Chang Y., Fan J., Zhang Z. Phloem loading in cucumber: combined symplastic and apoplastic strategies // *Plant J.* 2019. V. 98. P. 391.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.14224>
  72. Lemoine R., La Camera S., Atanassova R., Dédaldé-champ F., Allario T., Pourtau N., Bonnemain J.-L., Laloï M., Coutos-Thévenot P., Maurousset L., Faucher M., Girousse Ch., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 272.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00272>
  73. Grodzinski B., Jiao J., Leonardos E.D. Estimating photosynthesis and concurrent export rates in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> species at ambient and elevated CO<sub>2</sub> // *Plant Physiol.* 1998. V. 117. P. 207.  
<https://doi.org/10.1104/pp.117.1.207>
  74. Stitt M. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells // *Plant Cell Environ.* 1991. V. 14. P. 741.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01440.x>
  75. Cakmak I., Kirkby E.A. Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage // *Physiol. Plant.* 2008. V. 133. P. 692.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01042.x>
  76. Krapp A., Quick W.P., Stitt M. Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream // *Planta.* 1991. V. 186. P. 58.  
<https://doi.org/10.1007/BF00201498>
  77. Foyer C.H., Neukermans J., Queval G., Noctor G., Harbinson J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 1637.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers013>
  78. Van den Ende W., Valluru R. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 9.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern297>
  79. Nott A., Jung H.-S., Koussevitzky S., Chory J. Plastid-to-nucleus retrograde signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 739.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105310>
  80. Inaba T. Bilateral communication between plastid and the nucleus: plastid protein import and plastid-to-nucleus retrograde signaling // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010. V. 74. P. 471.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.90842>
  81. Ruckle M.E., DeMarco S.M., Larkin R.M. Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 3944.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.054312>
  82. Ruckle M.E., Burgoon L.D., Lawrence L.A., Sinkler C.A., Larkin R.M. Plastids are major regulators of light signaling in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2012. V. 159. P. 366.  
<https://doi.org/10.1104/pp.112.193599>
  83. Lepistö A., Rintamäki E. Coordination of plastid and light signaling 609 pathways upon development of *Arabidopsis* leaves under various photoperiods // *Mol. Plant.* 2012. V. 5. P. 799.  
<https://doi.org/10.1093/mp/sss106>
  84. Lanoue J., Zheng J., Little C., Thibodeau A., Grodzinski B., Hao X. Alternating red and blue light-emitting diodes allows for injury-free tomato production with continuous lighting // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1114.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01114>
  85. Lanoue J., Thibodeau A., Little C., Zheng J., Grodzinski B., Hao X. Light spectra and root stocks affect response of greenhouse tomatoes to long photoperiod of supplemental lighting // *Plants.* 2021. V. 10. P. 1674.  
<https://doi.org/10.3390/plants10081674>
  86. Peter E., Rothbart M., Oelze M.-L., Shalygo N., Dietz K.-J., Grimm B. Mg protoporphyrin monomethylester cyclase deficiency and effects on tetrapyrrole metabolism in different light conditions // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. P. 1229.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcq071>
  87. Graf A., Schlereth A., Stitt M., Smith A.M. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010. V. 107. P. 9458.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0914299107>
  88. Weise S.E., Schrader S.M., Kleinbeck K.R., Sharkey T.D. Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 879.  
<https://doi.org/10.1104/pp.106.081174>
  89. Lu Y., Gehan J.P., Sharkey T.D. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 2280.  
<https://doi.org/10.1104/pp.105.061903>
  90. James A.B., Monreal J.A., Nimmo G.A., Kelly C.L., Herzyk P., Jenkins G.I., Nimmo H.G. The circadian clock in *Arabidopsis* roots is a simplified slave version of the

- clock in shoots // *Science*. 2008. V. 322. P. 1832.  
<https://doi.org/10.1126/science.11614>
91. Zeeman S.C., Delatte T., Messerli G., Umhang M., Stetler M., Mettler T., Streb S., Reinhold H., Kotting O. Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms // *Func. Plant Biol.* 2007. V. 34. P. 465.  
<https://doi.org/10.1071/FP06313>
92. Pham D.M., Chun C. Growth and leaf injury in tomato plants under continuous light at different settings of constant and diurnally varied photosynthetic photon flux densities // *Sci. Hort.* 2020. V. 269. P. 109347.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109347>
93. Winkler A., Masclaux-Daubresse C., Fischer A.M. Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 1063.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erp067>
94. Lim P.O., Kim H.J., Gil Nam H. Leaf senescence // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007. V. 58. P. 115.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316>
95. Van Doorn W.G. Is the onset of *senescence* in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 1963.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern076>
96. Noodén L.D. The phenomena of senescence and aging // *Senescence and aging in plants* / Eds. L.D. Noodén, A.C. Leopold. San Diego, CA: Academic Press. 1988. 50 p.
97. Cushman K.E., Tibbitts T.W. Root-zone temperature effects on continuous irradiation injury on potato // *Hort. Sci.* 1991. V. 26. P. 745.
98. Tibbitts T.W., Bennett S.M., Cao W. Control of continuous irradiation injury on potato with daily temperature cycling // *Plant Physiol.* 1990. V. 93. P. 409.  
<https://doi.org/10.1104/pp.93.2.409>
99. Cao W., Tibbitts T.W. Temperature cycling periods affect growth and tuberization in potatoes under continuous light // *Hort. Sci.* 1992. V. 27. P. 344.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.4.344>



УДК 581.1

## РЕГЕНЕРАЦИЯ ПАПОРОТНИКОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПОСРЕДСТВОМ ЗЕЛЕННЫХ ГЛОБУЛЯРНЫХ ТЕЛ<sup>1</sup>

© 2023 г. Л. А. Шелихан\*

Амурский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического сада-института  
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Благовещенск, Россия

\*e-mail: solecito91@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2022 г.

После доработки 29.09.2022 г.

Принята к публикации 29.09.2022 г.

Зеленые глобулярные тела (от англ. green globular bodies, GGB) представляют собой особые побеги – пропагулы, формирующиеся при культивировании тканей растений *in vitro*. Благодаря высокой скорости размножения, GGB считаются экономически выгодными для регенерации *in vitro* важных пищевых и декоративных папоротников. Кроме того, размножение с использованием этих меристемных структур открывает большие перспективы сохранения редких или находящихся под угрозой исчезновения папоротников. Ткани GGB можно использовать для долгосрочного хранения методом криоконсервации клеточных культур *in vitro*. В обзоре представлено современное состояние исследований по размножению папоротников *in vitro* через регенерацию GGB. Рассмотрены понятие GGB и этапы их развития. Обсуждаются условия для введения в культуру *in vitro* GGB, их инициации, пролиферации, дифференциации, а также укоренения и акклиматизации спорофитов. Особое внимание уделено влиянию на эффективность размножения GGB состава питательных сред.

**Ключевые слова:** зеленые глобулярные тела, культура *in vitro*, папоротники, спорофит, эксплант

**DOI:** 10.31857/S0015330322600498, **EDN:** GKSFYD

### ВВЕДЕНИЕ

Папоротники (монилофиты) и ликофиты составляют около 4% всех растений Земли. Среди папоротников представлены виды, обладающие экономической, лекарственной, пищевой и биотехнологической ценностью [1–5]. Некоторые виды могут быть использованы в качестве биоиндикаторов радиационного загрязнения или для фиторемедиации, поскольку способны извлекать из почвы и накапливать в своих тканях вредные для окружающей среды вещества [6–10]. Большое число видов папоротников находится под угрозой исчезновения из-за разрушения и загрязнения местообитания, неконтролируемого сбора, внедрения инвазивных видов и изменения климатических условий. Многие виды папоротников включены в национальные и региональные Красные

книги [11, 12]. Получение таких меристемных структур как зеленые глобулярные тела (от англ. green globular body, GGB) для дальнейшего массового размножения спорофитов *in vitro* является перспективным и наиболее экономически выгодным для сохранения и воспроизводства хозяйственно-значимых, декоративных, редких или находящихся под угрозой исчезновения видов папоротников, а также для выведения их новых разновидностей [13, 14].

Цель обзора – обобщение информации о GGB как системе размножения папоротников в культуре *in vitro*.

### ПОНЯТИЕ GGB И ЭТАПЫ ИХ РАЗВИТИЯ

Меристемные структуры, о которых пойдет речь, впервые были описаны в 1987 г. в публикации по микроразмножению папоротника *Nephrolepis cordifolia* (L.) C. Presl Higuchi с соавторами [13]. В этой системе размножения впервые применяли термин “green globular body” (GGB). Меристемные многоклеточные тела были использованы в качестве промежуточной стадии для размножения перед получением спорофитов, а органогенез GGB контролировался единственным регулятором роста – 6-бензиламинопурином (БАП). Позднее, в 1989 г.

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330322600498 для авторизованных пользователей.

**Сокращения:** МС – полный состав минеральной основы МС-среды, 1/2МС – половинная концентрация минеральной основы МС-среды, 1/4МС – 1/4 концентрация минеральной основы МС-среды, 1/8МС – 1/8 концентрация минеральной основы МС-среды, 3/4МС – 75% концентрация минеральной основы МС-среды, GGB – зеленые глобулярные тела (green globular body).

в статье Higuchi и Amaki был опубликован протокол по размножению *in vitro* папоротника *Asplenium nidus* L., для которого была использована та же система [15]. Учеными было отмечено несколько преимуществ использования GGB для размножения папоротников: возможность легко контролировать ход органогенеза во время этапов культивирования, просто добавляя или удаляя регулятор роста растений, а также высокие коэффициенты и скорость размножения [16–18]. Последнее утверждение обусловлено тем, что материнские и дочерние GGB могли участвовать в одновременном формировании следующего вегетативного поколения [19].

По мнению Amaki и Higuchi, инициированная структура (GGB) функционально подобна протокорму орхидей [16], поскольку у обоих были мощные центры клеточного деления (клетки меристемы), которые регенерировали в придаточные побеги [15]. Однако протокормы представляют собой образующиеся спонтанно, свободно растущие многоклеточные комплексы, тогда как GGB не формируются на частях тканей экспланта до тех пор, пока не происходит инициация в культуре *in vitro*. Согласно другим исследователям, GGB имеют схожие с каллусом морфологические черты, так как функционально являются частью меристемы, в которой агрегированы зачатки побегов [20]. Тем не менее, формирование каллуса и регенерация побега – это две разные стадии в культуре тканей растений, образование одного каллуса недостаточно для регенерации побегов в отличие от GGB. Предполагают, что GGB представляют собой луковички, выводковые почки или меристематические узелки [19, 21–23]. В публикации 2021 г. GGB назвали особым побегом – пропагулой, инициируемой в системах культивирования растений *in vitro* [14]. Интересно, что GGB, происходящие от разных видов папоротников, проявляли отличительные особенности с точки зрения скорости роста, внешнего вида и размера [17, 19, 24]. Тем не менее, эти структуры окрашены в зеленый цвет из-за наличия хлорофилла в клетках и имели округлую форму, напоминающую стеклянные бусинки. При этом оттенки зеленого варьировали от коричнево- и желто-зеленого до ярко- и темно-зеленого [17, 22, 24, 25]. В процессе развития GGB были связаны с материнской меристемной тканью через корнеобразные структуры – бледно-коричневые ризоиды [14, 17, 24]. Иногда на поверхности некоторых культур GGB помимо этих ризоидов, можно было увидеть чешуйчатые или трихомоподобные структуры [14, 17, 21, 24, 25].

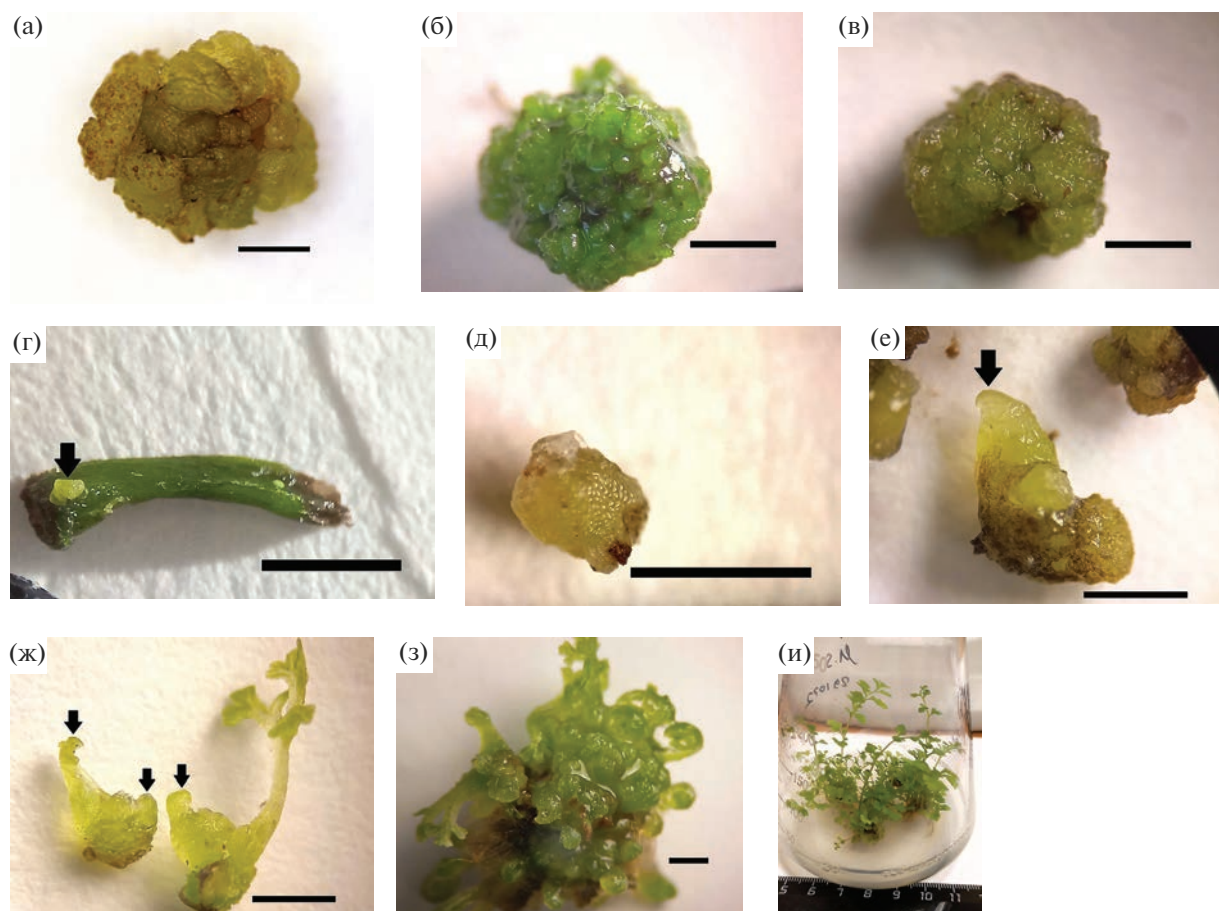
Однако исследователи детально не рассматривали цито- и гистологическое происхождение GGB. Наиболее общей чертой GGB является то, что они содержат области множественных клеточных делений во внутренних тканях и/или в

эпидермальном слое самих GGB [13, 16], а также развивающиеся проводящие ткани внутри [14].

Этапы развития GGB можно наблюдать под бинокляром. Процесс инициации начинается с формирования твердой массы зеленой меристемной ткани на экспланте. По одним данным она напрямую связана с основной системой сосудистых пучков эксплантов, однако эта связь исчезла после развития GGB [19]. По другим данным, между ними не было обнаружено соединяющей их проводящей ткани. Вместо этого связь между тканью и эксплантом обеспечивали клетки, которые выглядели инвазивными в тканях экспланта [14]. Следующий этап – это непосредственно пролиферация GGB. В это время одиночное тело едва различимо, оно не отделяется от зеленой массы, либо отделяется с трудом. Его верхняя часть имеет плоскую или куполообразную форму [25]. Тем не менее, возникшие множественные меристематические области отчетливо видны на поверхности или во внутренней части GGB. Впоследствии развившиеся GGB легко отделяются от основной массы и способны дифференцироваться в спорофиты [17, 26]. Это проявлялось в виде удлинения тела и появления выступа на поверхности GGB. Чем больше развивалось спорофитов, тем меньше площади поверхности GGB оставалось для мест активного деления и размножения клеток меристем. Как только масса GGB оказывалась полностью покрыта регенерированными спорофитами, одиночный GGB деформировался и прекращал дальнейшее размножение [17]. Процессы пролиферации и дифференциации чаще всего накладывались друг на друга, поскольку шли одновременно [14]. Есть мнение, что способность к самостоятельному формированию начальной многопобеговой меристемы GGB одинакова лишь на начальной стадии побегообразования *in vitro*, а впоследствии качественные и количественные показатели различаются при одинаковых условиях для разных видов [19].

Способ пролиферации GGB у разных видов папоротников может отличаться. Например, меристемы могут быть локализованы во внутренней части GGB, окружая центральную систему сосудистого пучка, при этом каждая меристема связана с сосудистой системой. С развитием меристематических тканей в GGB некоторые меристемы выходят на поверхность, и каждый выступ формирует новый GGB [13]. С другой стороны, клеточные деления могут активизироваться и на периферии GGB [13, 15]. При этом на поверхности GGB зарождаются многочисленные меристемы, некоторые из которых формируют новые GGB [15]. Иногда эти способы пролиферации могут сочетаться [14].

Отдельный GGB обладает двумя важными областями меристемы: апикальной меристемой в



**Рис. 1.** Размножение папоротников в культуре *in vitro* через регенерацию зеленых глобулярных тел (green globular bodies, GGB): а – GGB *Matteuccia struthiopteris*; б – GGB *Polystichum craspedosorum*; в – GGB *Aleuritopteris kuhnii*; г – начало развития GGB на экспланте *M. struthiopteris*. Стрелка указывает на формирующуюся меристему; д – одиночный GGB *M. struthiopteris*; е, ж, з – дифференциация GGB *M. struthiopteris*. Стрелками отмечены выступы на GGB; и – спорофиты *M. struthiopteris*, развившиеся из GGB. а–и: масштаб 1 мм.

верхней части и корневой меристемой в нижней части. Во время стадии дифференциации апикальная меристема преобразуется в молодой побег, а корневая меристема дает начало корням или нескольким корнеобразным структурам, в результате чего один GGB всегда формирует один спорофит [24, 25]. Следует отметить, что в процессе регенерации спорофитов из GGB исследователями также было отмечено несколько примеров спонтанной апоспории с образованием гаметофитов, соответствующих гаметофитам, продуцируемым из спор [21, 25].

Все растения, полученные с помощью этой системы размножения *in vitro*, были фенотипически однородными и соответствовали фенотипу растений-доноров [15, 16, 21, 46]. Фенотипическую однородность проверяют путем сравнения морфологических признаков папоротников-доноров и папоротников, полученных в результате размножения *in vitro* через регенерацию GGB, акклиматизированных и выращенных в тепличных условиях.

Принято считать, что регенерация через систему GGB в условиях *in vitro* является уникальной системой для размножения папоротников [13, 24]. Однако есть информация, что подобные GGB структуры наблюдали у трех видов цветковых растений [27–29].

В качестве наглядного примера на рисунке 1 показаны группы GGB трех видов папоротников: *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod., *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels. и *Aleuritopteris kuhnii* (Milde) Ching, а также отдельные стадии формирования GGB и спорофитов на примере *M. struthiopteris*.

#### ЭКСПЛАНТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ GGB

На данный момент известно о 24 видах папоротников, принадлежащих к 11 семействам, размноженных через регенерацию GGB (табл. 1).

В качестве донора для получения GGB ряд авторов использовали спорофиты из природных популяций, коллекций *ex situ* и коммерческого

Таблица 1. Регенерация различных видов папоротников в культуре *in vitro* посредством GGB

| Семейство        | Вид   | Эксплант  | Продуцирование GGB |       |      | Ссылка   |
|------------------|---|---|--------------------|-------|------|----------|
|                  |   |   | %                  | г     | шт   |          |
| Aspleniaceae     | <i>Asplenium delavayi</i> (Franch.) Copel.<br>(= <i>Sinephropteris delavayi</i> (Franch.) Mickel) | Вайя молодого спорофита                                       | 30                 | –     | –    | [30]     |
| Aspleniaceae     | <i>Asplenium nidus</i> L.   | Сегмент корневища   | 100                | –     | –    | [15, 16] |
| Aspleniaceae     | <i>Asplenium nidus</i> L.<br>(= <i>Neottopteris nidus</i> (L.) J. Sm.)                            | Молодой спорофит <i>in vitro</i>                              | 100                | –     | –    | [38]     |
| Aspleniaceae     | <i>Asplenium scolopendrium</i> var.<br><i>americanum</i> (Fernald) Kartesz<br>& Gandhi            | Молодой спорофит  | 84                 | –     | –    | [39]     |
| Athyriaceae      | <i>Athyrium niponicum</i> (Mett.)<br>Hance  | Сегмент корневища<br>молодого спорофита<br><i>in vitro</i>    | –                  | 0.171 | –    | [37]     |
| Athyriaceae      | <i>Diplazium nipponicum</i> Tgawa   | Сегмент корневища   | –                  | 2.27  | –    | [31]     |
| Blechnaceae      | <i>Blechnum spicant</i> (L.) Roth   | Сегмент корневища<br>ювенильного спорофита<br><i>in vitro</i> | –                  | –     | –    | [35]     |
| Dennstaedtiaceae | <i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn  | –   | –                  | –     | –    | [14]     |
| Dryopteridaceae  | <i>Polystichum craspedosorum</i><br>(Maxim.) Diels.   | Молодой спорофит <i>in vitro</i>                              | –                  | –     | 20.2 | [26]     |
| Dryopteridaceae  | <i>Rumohra adiantiformis</i><br>“Florida”   | Сегмент корневища   | –                  | –     | –    | [16]     |
| Cibotiaceae      | <i>Cibotium barometz</i> (L.) J. Sm.  | Ювенильный спорофит<br><i>in vitro</i>                        | 86.67              | –     | –    | [25]     |
| Nephrolepidaceae | <i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) C.<br>Presl  | Сегмент корневища   | 73.3               | –     | –    | [13, 16] |
| Nephrolepidaceae | <i>Nephrolepis exaltata</i> (L.) Schott   | Сегмент корневища   | –                  | –     | 8    | [42]     |
| Nephrolepidaceae | <i>Nephrolepis exaltata</i> (L.) Schott   | Сегмент корневища   | 100                | –     | –    | [32]     |
| Nephrolepidaceae | <i>Nephrolepis exaltata</i> Schott cv.<br><i>bostoniensis</i>                                     | Сегмент корневища   | –                  | –     | –    | [23]     |
| Nephrolepidaceae | <i>Nephrolepis exaltata</i><br>“Bostoniensis Murano”  | –   | –                  | –     | –    | [49]     |
| Onocleaceae      | <i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.)<br>Tod.   | Боковые побеги<br>на корневище                                | 78.8               | –     | –    | [22]     |
| Onocleaceae      | <i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.)<br>Tod.   | Молодой спорофит  | –                  | –     | –    | [46]     |
| Onocleaceae      | <i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.)<br>Tod.   | –   | 98.24              | –     | –    | [47]     |
| Polypodiaceae    | <i>Drynaria roosii</i> Nakaike  | Сегмент ювенильного<br>спорофита <i>in vitro</i>              | –                  | –     | –    | [48]     |
| Polypodiaceae    | <i>Platyserium bifurcatum</i> (Cav.)<br>C. Chr.   | Вайя ювенильного<br>спорофита <i>in vitro</i>                 | 90                 | –     | –    | [21]     |

Таблица 1. Окончание

| Семейство     | Вид   | Эксплант  | Продуцирование GGB |      |    | Ссылка |
|---------------|---|---|--------------------|------|----|--------|
|               |   |   | %                  | г    | шт |        |
| Polypodiaceae | <i>Platyserium bifurcatum</i> (Cav.) C. Chr.                  | Вайя ювенильного спорофита <i>in vitro</i>              | 95.56              | —    | —  | [17]   |
| Polypodiaceae | <i>Platyserium grande</i> (A. Cunn.) J. Sm.                   | Вайя ювенильного спорофита <i>in vitro</i>              | 27.1               | —    | —  | [43]   |
| Polypodiaceae | <i>Platyserium willinckii</i> T. Moore                        | Вайя ювенильного спорофита <i>in vitro</i>              | 58.3               | —    | —  | [43]   |
| Polypodiaceae | <i>Polypodium cambricum</i> L.                                | Ювенильный спорофит <i>in vitro</i>                     | 80                 | —    | —  | [41]   |
| Pteridaceae   | <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.                           | Листочек с вайи   | —                  | —    | —  | [33]   |
| Pteridaceae   | <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.                           | Свернутая вайя “улитка”                                 | —                  | —    | —  | [34]   |
| Pteridaceae   | <i>Adiantum raddianum</i> “Fritz Luthi”                       | Сегмент корневища                                       | 100                | —    | —  | [16]   |
| Pteridaceae   | <i>Pteris aspericaulis</i> var. <i>tricolor</i> Moore in Lowe | Ювенильный спорофит <i>in vitro</i>                     | 90                 | —    | —  | [24]   |
| Pteridaceae   | <i>Pteris cretica</i> “Wilsonii”                              | Сегмент корневища                                       | —                  | 0.01 | —  | [20]   |
| Pteridaceae   | <i>Pteris ensiformis</i> Burm.                                | Сегмент корневища ювенильного спорофита <i>in vitro</i> | —                  | —    | —  | [35]   |
| Pteridaceae   | <i>Pteris ensiformis</i> “Victoriae”                          | Сегмент корневища                                       | 100                | —    | —  | [16]   |
| Woodsiaceae   | <i>Woodsia alpina</i> (Bolton) Gray                           | Молодой спорофит <i>in vitro</i>                        | —                  | —    | —  | [36]   |

Примечание: Прочерк “—” означает отсутствие информации.

ассортимента папоротников [15, 22, 30–34]. В этом случае требовалась подготовка растительного материала: обрезка и предварительная его промывка, поскольку сопутствующее загрязнение и/или лишние ткани могли затруднить процесс обработки стерилизующими агентами для последующего введения в культуру *in vitro*. В случае использования спорофитов, полученных в асептических условиях от гаметофитов *in vitro*, этап с поверхностной стерилизацией тканей исключался [14, 15, 17, 19–21, 24–26, 35–38].

Эксплантами для получения GGB могут служить различные части зрелых спорофитов: вайи, листочки с вай или их отдельные сегменты, верхушки и отводки укореняющихся побегов, сегменты черешка, сегменты корневища, придаточных корней и части их боковых побегов [13, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 31–34, 37, 39–42]. Ряд авторов использовали в качестве эксплантов для получения GGB целые ювенильные, молодые спорофиты и их отдельные части [14, 21, 24–26, 30, 35, 39, 41, 43]. Самую низкую способность к образованию GGB имели кончики корней ювенильного споро-

фита *Polypodium cambricum*: в основном на этом типе экспланта развивались гаметофиты [41].

Некоторые исследователи гомогенизировали ткани вайи или корневища для более активного образования GGB [40, 41]. Однако в этом случае имелся ряд недостатков: необходимо было учитывать размер эксплантов и выбирать относительно молодые растения-доноры. Тем не менее, гомогенизация оказалась эффективной в стимулировании размножения посредством GGB *in vitro* [19, 40, 41].

## ИНИЦИАЦИЯ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ GGB

Для поверхностной стерилизации эксплантов исследователи применяли различные стерилизующие агенты. Например, использование 70% этилового спирта с различным временем обработки было наиболее популярным [15, 31, 32, 42, 39]. В ряде работ использовали 1% гипохлорит кальция [13], 1% гипохлорит натрия [31, 42], 0.025% [22] и 0.1% HgCl<sub>2</sub> [30], стрептомицин [42]. Иногда использовали растворы коммерческих отбеливателей в различных концентрациях: 15%

(5.25% гипохлорит натрия) [23], 10% [32], 1 : 20 (содержание хлора 0.26%) [39]. В некоторых случаях для лучшего смачивания поверхности эксплантов к стерилизирующему агенту добавляли эмульгатор Твин-20 в концентрации 0.1% [13] или 0.05% [39].

Согласно имеющимся публикациям, во всех исследованиях для инициации и пролиферации GGB были использованы среды на основе МС-среды [44] (табл. S1, Дополнительные материалы). Полутвердые среды с агаром поддерживали рост тканей лучше, чем жидкие среды при постоянном перемешивании, поэтому GGB на агаризованных средах росли быстрее и были более компактными, по сравнению с рыхлыми, отслоившимися GGB на жидких средах. Причиной снижения роста GGB при выращивании на качалках было механическое повреждение меристемы, инициированное на поверхности GGB, от прикосновения к культуральному сосуду [15, 22]. Наиболее используемые концентрации агара находились в пределах 0.65–0.80%. Было установлено, что отсутствие сахарозы или ее избыточная концентрация снижали количественные показатели размножения GGB [15, 26, 37]. Стандартная концентрация сахарозы для инициации и пролиферации GGB составляла 1–3%. Согласно большому числу доступных исследований, максимальная продуктивность в регенерации GGB у разных видов была достигнута на МС-среде полного состава или ее половинной концентрации (1/2МС), а менее всего – на более разбавленных МС-средах (1/4МС и 1/8МС). Таким образом, уменьшение концентрации солей приводило к снижению способности к регенерации и роста GGB [14, 15].

Продукция GGB было одинаковым при освещении белым, синим или красным светом культуры папоротника *Pteris aspericaulis* var. *tricolor* [24].

Учитывая, что ткани GGB папоротника *Platyserium bifurcatum* и *Athyrium niponicum* при культивировании на среде с активированным углем начинали чернеть, использование такой добавки не рекомендовано [17, 37].

GGB способны формироваться и размножаться на средах с различными регуляторами роста. Так, упомянутыми регуляторами роста из группы цитокининов были БАП, кинетин (Кин), 2-изопентиладенин (2iP), тидиазурон (ТДЗ). Некоторые исследователи включали в состав культуральной среды сульфат аденина (Ас), который считается предшественником цитокининов и оказывает сходное с ними действие [42]. В качестве ауксинов в питательных средах использовали ИУК, НУК и индолмасляную кислоту (ИМК). В одном из исследований в среду добавляли АБК, поскольку она тормозила ростовые реакции, которые вызывали

регуляторы роста, что было полезным при криоконсервации [39].

Большинство исследователей использовали БАП (1–2 мг/л) на стадиях инициации и пролиферации [14, 23, 31]. В отдельных случаях, добавление в среду БАП (0.5 мг/л) для культивирования сегментов GGB *Pteris ensiformis* “*Victoriae*” и БАП (1 мг/л) в сочетании с НУК (1 мг/л) для *Adiantum raddianum* “*Fritz Luthi*” также способствовало пролиферации GGB [16]. В исследованиях Li с соавт. [33, 38] среда для культивирования *A. nidus* была дополнена БАП (2 мг/л) и НУК (0.1 мг/л), а для *Adiantum capillus-veneris* – только БАП (2 мг/л), что оказывало положительный эффект на формирование GGB указанных видов. Любопытно, что при включении в среды БАП (1.2 мг/л или 2.3 мг/л) GGB *P. bifurcatum* имели небольшие различия в размерах: в последнем варианте GGB были более мелкими. Однако при использовании обеих концентраций размеры GGB были меньше, чем на среде без цитокинина. Несмотря на это, наличие БАП способствовало формированию большего количества GGB, но их дальнейшая дифференциация была медленнее по сравнению с GGB на среде без цитокининов, из-за чего разделение GGB было затруднительно. Есть мнение, что различия в реакции на добавление БАП зависят от возраста и исходного размера экспланта [21]. В исследовании Liao и Wu увеличение концентрации цитокинина (БАП или 2iP) для *P. bifurcatum* показало постепенное снижение продуцирования GGB [17]. Однако добавление БАП на стадии инициации оказывало более сильный ингибирующий эффект на формирование GGB, чем применение 2iP. Это связано с тем, что 2iP – естественно продуцируемый регулятор роста в папоротниках [17]. В другом исследовании [24], с увеличением концентрации БАП или ТДЗ частота индукции GGB *P. aspericaulis* var. *tricolor* возрастала, а регенерация спорофитов ингибировалась. Добавление в питательные среды ТДЗ (1 мг/л) и ТДЗ (0.6 мг/л) было оптимальным для продуцирования GGB у *Cibotium barometz* [25] и у *P. aspericaulis* var. *tricolor* [24], соответственно. Интересно, что использование НУК (1.2 мг/л) без цитокининов, напротив, показало наилучший результат у *P. bifurcatum*. При этом одиночные GGB хорошо пролиферировали на среде с добавлением НУК (1.2 мг/л) и 2iP (0.5 мг/л). Они показали меньшее образование спорофитов, но более быстрое увеличение массы GGB в диаметре [17].

Индукция GGB также была отмечена на питательных средах без регуляторов роста [13, 15, 17, 20, 26, 32, 37, 41]. Считается, что потребность в экзогенных регуляторах роста зависит от уровня эндогенных гормонов в организме растений. Таким образом, образование GGB на эксплантах из ювенильных спорофитов при культивировании на питательной среде без регуляторов роста мо-

жет быть результатом более высоких уровней эндогенных гормонов [21]. Ряд исследователей считают, что чередование сред положительно влияет на процессы культивирования [15, 16].

Такие показатели как температура, рН питательной среды и суточный ритм освещения в большинстве случаев были общими для всех стадий культивирования. Так, температурный режим варьировал в пределах от 21 до 25°C, а фото-период составлял 16/8 ч. Питательные среды имели рН 5.0–5.8. Время до начала регенерации тканей в GGB по совокупной информации занимало от нескольких недель до нескольких месяцев.

### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ GGB

Долгосрочное сохранение генофонда папоротников методом криоконсервации клеточных культур *in vitro* рекомендовано для тех видов, споры которых трудно собрать или получить даже в небольших количествах [45]. Однако технология криоконсервации тканей спорофитов и гаметофитов изучена гораздо меньше, чем криоконсервации спор [2]. Опубликовано лишь несколько сообщений о криоконсервированных тканях спорофитов редких таксонов папоротников, поэтому это направление является перспективным и нуждается в дальнейших исследованиях. Известно, что длительное сохранение папоротников *in vitro* путем криоконсервации возможно с использованием GGB [2, 38, 39]. Например, GGB *Asplenium scolopendrium* var. *americanum* были успешно заморожены с применением метода инкапсуляции-дегидратации. Для этого использовали группы GGB размером 2–3 мм. В результате исследования выяснили, что ткани GGB сохранили жизнеспособность после криоконсервации. Важно отметить, что предварительное культивирование на среде, содержащей АБК, увеличивало выживаемость GGB [39]. В другом исследовании для заморозки GGB папоротника *A. nidus* исследователи использовали метод витрификации в каплях [38]. Для этого на этапе подготовки были отобраны GGB (длина 0.5–1 мм), а также использованы суспензионные культуры клеток GGB. В течение 30–90 дней после оттаивания культуры GGB *A. nidus* эти структуры прошли различные стадии развития. Сначала они чернели из-за процессов окисления, а потом регенерировали новую каллусную ткань и формировали новые меристемы, из которых сформировались GGB, что в конечном итоге привело к дифференциации спорофитов. При этом продление периода культивирования привело к дальнейшему увеличению количества спорофитов. Суспензионные культуры клеток GGB также показали аналогичную способность к вторичному росту.

### ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ GGB

Практически во всех исследованиях указано, что GGB наилучшим образом развиваются в спорофиты при культивировании на среде, не содержащей регуляторов роста [13–17, 19–21, 24, 30, 34, 35, 37, 40–42, 46, 47]. При этом дифференциация GGB могла быть неодновременной, как в случае с *P. bifurcatum* [21]. Известно, что группы GGB *A. nidus* регенерировали в проростки спорофитов на среде без регуляторов роста уже через 2 недели. А через 8 недель после субкультивирования, каждый проросток развивался в спорофит, потенциально готовый к акклиматизации [15]. Похожие результаты описаны для *Pteris cretica* “Wilsonii”, *P. ensiformis* “Victoriae”, *N. cordifolia* и *A. niponicum*. При использовании сред без добавления регуляторов роста все GGB были дифференцированы в спорофиты, тогда как при применении регуляторов роста формирование вай ингибировалось, а сегменты GGB продуцировали только новые меристемы и GGB [16, 20, 37].

Чаще всего исследователи использовали следующие концентрации солей: полный набор МС, 1/2МС и 1/4МС. Высокие концентрации минеральных солей и витаминов в питательной среде подавляли рост побегов [20]. Например, GGB *Nephrolepis exaltata* лучше формировали спорофиты на 3/4МС, чем на полной среде МС [32]. У *P. aspericaulis* var. *tricolor* частота дифференциации GGB на средах 1/4МС и 1/2МС была выше, чем на полной МС. Низкая концентрация минеральных солей способствовала лучшей дифференциации GGB в проростки спорофитов [24]. Основные рекомендуемые концентрации сахарозы для развития спорофитов находились в пределах 1–3%. Концентрация агара для получения спорофитов по результатам большинства исследований варьировала от 0.65 до 0.80%.

Добавление активированного угля в питательную среду значительно ингибировало развитие спорофитов [17]. Однако, для *P. aspericaulis* var. *tricolor* добавление активированного угля было полезно на этапе формирования спорофитов, но затем его исключали [24].

При регенерации спорофитов *P. aspericaulis* var. *tricolor* из GGB спектры света (белый, синий, красный) не влияли на частоту дифференциации GGB, но заметно воздействовали на дальнейший рост спорофитов в высоту. Красный свет способствовал удлинению черешка и получению максимальной высоты ювенильного спорофита (5.70 см). Синий свет, напротив, тормозил удлинение черешка, спорофиты достигали минимальной высоты (3.38 см). Кроме того, различное качество света светодиодов также влияло на морфологию и цвет вай. В отличие от спорофитов под белыми светодиодами, имеющими нормальную морфологию вай, цвет вай был более насыщенным под

синими светодиодами и светлее под красными светодиодами. Спорофиты под белыми или красными светодиодами показали нормальный размер вай, тогда как под синим светом они были меньше [24].

### ТЕМПЫ РАЗМНОЖЕНИЯ

Практически во всех работах качественные и количественные показатели размножения папоротников посредством продуцирования GGB варьировали в зависимости от вида, но были достаточно высокими. Например, для *N. cordifolia* можно было получить 160000 проростков от одного экспланта за 6 месяцев [13]. У большинства эксплантов *P. bifurcatum*, культивируемых в течение 40 дней на среде без БАП, было сформировано 10–35 GGB, а после 3 месяцев культивирования с одного листового экспланта было получено до 150 спорофитов. Кроме того, эффективность регенерации GGB в определенной степени варьировала как в группе GGB на экспланте, так и между эксплантами на одной и той же среде [21]. В исследовании Liao и Wu [17] было получено около 170 спорофитов на один исходный листовой эксплант *P. bifurcatum* в течение 32-недельного периода культивирования. По мнению авторов, количество продуцированных спорофитов могло быть дополнительно увеличено путем перевода культур GGB в условия циклического размножения. В публикации 1999 г. сообщалось, что количество клонированных с помощью GGB спорофитов *M. struthiopteris* превышало 5000 [46]. В статье Bertrand с соавт. [41] с помощью гомогенизации 1 г вайи *P. cambricum* и последующем формировании GGB получали 980 спорофитов за 10 месяцев. В эксперименте с *N. exaltata* на одном экспланте сформировалось по 5–8 проростков [42]. Таким образом, по сравнению с обычным размножением спорами, система размножения GGB более эффективна по скорости и количеству получаемых спорофитов и может быть использована для коммерческого микроразмножения папоротников.

### УКОРЕНЕНИЕ И АККЛИМАТИЗАЦИЯ СПОРОФИТОВ

Образование корней у спорофитов в условиях *in vitro* может быть спонтанным или направленным (в отсутствие и присутствии регуляторов роста, соответственно), в условиях *in vitro* и при акклиматизации. Спорофиты *Pteridium aquilinum* и *N. exaltata* укореняли на 1/2МС с НУК (0.1 мг/л) [14] и на МС с ИУК (1.9 мг/л) [32] соответственно. Не укоренившиеся спорофиты *P. bifurcatum* с 3–6 вайями изымали из среды и промывали от остатков агара. Затем спорофиты переносили в горшки с субстратом *ex vitro* для акклиматизации, где они показали спонтанное развитие корней в

течение первых 4 недель [17]. Спорофиты папоротника *A. raddianum* “Fritz Luthi” были обработаны НУК с целью инициации ризогенеза, однако корнеобразование у них было слабым. Тем не менее, спорофиты этого же папоротника с развитыми вайями успешно укоренились на стадии акклиматизации [16]. Имеются данные, что рост спорофитов и корней в длину был наиболее интенсивным на средах без регулятора роста, а полученные в результате культивирования спорофиты были пригодны для акклиматизации без дополнительных манипуляций [20, 30]. Например, укореняемость спорофитов *Asplenium delavayi* на среде без регуляторов роста составила 100% [30]. Также регенерированные проростки *P. bifurcatum* с хорошо развитыми корнями изымали из безгормональной среды, переносили в почву и выдерживали при высокой относительной влажности 2 недели, а затем помещали в теплицу [21]. По результатам исследований Higuchi и Amaki [15], акклиматизация побегов *A. nidus* в вермикулите привела к образованию корней у 90% побегов после 4 недель. При этом обработка регуляторами роста не способствовала укоренению или его угнетению.

В качестве почвенного субстрата для акклиматизации спорофитов исследователи использовали сфагнум, вермикулит, перлит, речной песок, почвенный грунт, торф и их смеси. Состав и соотношения субстратных компонентов были различными: вермикулит и торф (1:1) [17], перлит и торф (1 : 8) [24], вермикулит и почвенный грунт (1 : 1) [34], торф и речной песок (1:1) [14], сфагнум и перлит (4 : 1) [32]. В качестве емкостей для субстратов использовались пластиковые горшки и контейнеры. Помимо своевременного полива, емкости с субстратом иногда переносили в контейнеры с водой (глубина 1.5 см) и накрывали прозрачным целлофаном. Температуру для акклиматизации папоротников поддерживали в диапазоне 20–30°C. Выживаемость спорофитов всегда была достаточно высокая, например, для *A. delavayi* она достигала 80% [30].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование системы размножения папоротников *in vitro* посредством GGB расширяет возможности использования культуры тканей и открывает новые перспективы ее применения. Основными преимуществами данной системы размножения являются: большое количество спорофитов, образующихся в расчете на один эксплант без промежуточной стадии каллусообразования; возможность влиять на количество и темпы размножения GGB; хорошая укореняемость спорофитов без дополнительных манипуляций; однородность полученных растений; возможность использовать GGB для долгосрочного сохранения



генофонда папоротников методом криоконсервации клеточных культур *in vitro*. GGB могут быть ключевым и непрерывно поставляемым материалом для размножения *in vitro* редких, декоративных, лекарственных и пищевых папоротников. Все это делает указанную систему размножения пригодной и экономически выгодной для их массового получения. Условия инициации, пролиферации и дифференциации GGB могут варьировать между видами или быть общими для нескольких видов. Тем не менее, наиболее важным фактором является состав питательной среды. Литературные данные позволяют адаптировать и модифицировать уже известные условия культивирования для конкретных видов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Регистрационный номер: 122040800086-1).

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов. Настоящий обзор не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rahayu E.M.D., Isnaini Y., Prartosuwiryo T.N.* Induction of sporophyte formation on prothallus mass of the golden chicken fern (*Cibotium barometz*) *in vitro* // *Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon.* 2015. V. 1. P. 814. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010425>
2. *Ballesteros D., Pence V.C.* Fern conservation: spore, gametophyte, and sporophyte *ex situ* storage, *in vitro* culture, and cryopreservation // *Current Advances in Fern Research.* 2018. P. 227. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_11)
3. *Шелихан Л.А., Некрасов Э.В.* Размножение папоротников посредством спор в культуре *in vitro* (обзор литературы) // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. 2018. Вып. 20. С. 23. <https://doi.org/10.17581/bbgi2003>
4. *Adebiyi A.O., Oyeyemi S.D., Tedela P.O., Ojo V.I.* GC-MS analysis of bioactive compounds from n-hexane leaf extract of a tropical fern, *Nephrolepis cordifolia* (L) C. Presl. // *EAS J. Biotechnol. Genet.* 2019. V. 1. P. 118. [https://www.easpublisher.com/media/features\\_articles/EASJBG\\_15\\_118-123.pdf](https://www.easpublisher.com/media/features_articles/EASJBG_15_118-123.pdf)
5. *Chettri U., Kumari S., Chettri B.* A review on anti-microbial and hepatoprotective properties of himalayan wild fern *Nephrolepis cordifolia* (Pani Amla) // *Pharma Innovation.* 2020. V. 9. P. 572.
6. *Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W.H., Cai Y., Kennelly E.D.* A fern that hyperaccumulates arsenic // *Nature.* 2001. V. 409. P. 579. <https://doi.org/10.1038/35054664>
7. *Zhao F.J., Dunham S.J., McGrath S.P.* Arsenic hyperaccumulation by different fern species // *New Phytol.* 2002. V. 156. P. 27. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00493.x>
8. *Trotta A., Mantovani M., Fusconi A., Gallo C.* *In vitro* culture of *Pteris vittata*, an arsenic hyperaccumulating fern, for screening and propagating strains useful for phytoremediation // *Caryologia.* 2007. V. 60. P. 160. <https://doi.org/10.1080/00087114.2007.10589566>
9. *Малюта О.В., Гончаров Е.А.* Биоиндикация в условиях радиоактивного загрязнения // *Вестник МарГТУ.* 2008. № 1. С. 80.
10. *Hansa J., Chakraborty B., Laskar B.A., Behera S.K., Patel A.K.* *Pteris vittata* propagation through different exposure of chromium concentration: an experiment to comprehend phytoremediation properties // *Adv. Biores.* 2013. V. 4. P. 43.
11. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). МПР РФ; Росприроднадзор; РБО; МГУ им. М.В. Ломоносова. Москва: Т-во науч. изд. КМК, 2008. с. 855. <http://oopt.aari.ru/ref/38>
12. Красная книга Амурской области: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. 2-е изд. Благовещенск: Изд-во ДальГАУ, 2020. 499 с. <http://www.amurohota.ru/files/RedBookAmur2020.pdf>
13. *Higuchi H., Amaki W., Suzuki S.* *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Prsel. // *Sci. Hortic.* 1987. V. 32. P. 105. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(87\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0304-4238(87)90021-5)
14. *Wang Z., Sun L., Wu C., Shi Y.* Study on GGB tissue culture domestication technology and transplanting acclimatization in *Pteridium aquilinum* L. Kuhn // *Rain Fed Crops.* 2016. Is.1. P. 27. [http://caod.oriprobe.com/articles/48966325/Study\\_on\\_GGB\\_Tissue\\_Culture\\_Domestication\\_Technology\\_and\\_Transplanting.htm](http://caod.oriprobe.com/articles/48966325/Study_on_GGB_Tissue_Culture_Domestication_Technology_and_Transplanting.htm)
15. *Higuchi H., Amaki W.* Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation // *Sci. Hortic.* 1989. V. 37. 351. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90146-5)
16. *Amaki W., Higuchi H.* A possible propagation system of *Nephrolepis*, *Asplenium*, *Pteris*, *Adiantum* and *Rumohra* (Arachniodes) through tissue culture // *Acta Hortic.* 1992. V. 300. P. 237. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.300.33>
17. *Liao Y.K., Wu Y.H.* *In vitro* propagation of *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. via green globular body initiation // *Bot. Stud.* 2011. V. 52. P. 455.
18. *Johari D., Singh A.P.* Biotechnology in clone gametophytes: future perspectives in homosporous ferns // *Current Advances in Fern Research.* 2018. P. 75. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_4)
19. *Rybczynski J.J., Tomiczak K., Grzyb M., Mikula A.* Morphogenic events in ferns: single and multicellular explants *in vitro* // *Current Advances in Fern Research.* 2018. P. 99. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_5)
20. *Shin S.L., Lee C.H.* Medium composition affecting *in vitro* plant regeneration and acclimation of *Pteris cretica* 'Wilsonii' // *Korean J. Plant Res.* 2009. V. 22. P. 394. [https://www.researchgate.net/publication/264032686\\_Medium\\_Composition\\_Affecting\\_In\\_Vitro\\_Plant](https://www.researchgate.net/publication/264032686_Medium_Composition_Affecting_In_Vitro_Plant)

- Regeneration\_and\_Acclimation\_of\_Pteris\_cretica\_Wilsonii'
21. Camloh M., Gogala N., Rode J. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platyserium bifurcatum in vitro* // Sci. Hortic. 1994. V. 56. P. 257. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0304-4238(94)90007-8)
  22. Thakur R.C., Hosoi Y., Ishii K. Rapid *in vitro* propagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro – an edible fern // Plant Cell Rep. 1998. V. 18. P. 203. <https://doi.org/10.1007/s002990050557>
  23. Hagiabad M.S., Hamidoghli Y., Gazvini R.F. Effects of different concentrations of mineral salt, sucrose and benzyladenine on Boston fern (*Neprolepis exaltata* Schott cv. *Bostoniensis*) runner tips initiation // J. W. S. S.-Isf. Univ. Technol. 2007. V. 11. P. 137.
  24. Yu R., Li F., Wang G., Ruan J., Wu L., Wu M., Yang C., Shan Q. *In vitro* regeneration of the colorful fern *Pteris aspericaulis* var. *tricolor* via green globular bodies system // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2021. V. 57. P. 225. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10059-y>
  25. Yu R., Zhang G., Li H., Cao H., Mo X., Gui M., Zhou X., Jiang Y., Li S., Wang J. *In vitro* propagation of the endangered tree fern *Cibotium barometz* through formation of green globular bodies // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2017. V. 128. P. 369. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1116-0>
  26. Шелухан Л.А. Влияние различных концентраций сахарозы на формирование зеленых глобулярных тел (GGB) у *Polystichum craspedosorum* (Maxim.) Diels *in vitro* // Труды Международной научной конференции, посвященной 140-летию Сибирского ботанического сада Томского государственного университета “Ботанические сады как центры изучения и сохранения фиторазнообразия”. Томск. 2020. С. 210. <https://doi.org/10.17223/978-5-94621-956-3-2020-67>
  27. Mosonyi I.D., Tilly-Mandy A., Stefanovits-Banyai E. Growing *Spathiphyllum in vitro*: evaluation of some combinations of carbohydrate sources and minerals in the media regarding peroxidase enzyme activity and chlorophyll content // Acta Hortic. 2012. V. 961. P. 279. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.961.36>
  28. Tzatzani T.T., Dimassi-Theriou K., Yupsanis T., Bosabalidis A., Therios I., Sarropoulou V. Globular body production, their anatomy, DNase gel analysis and NDP kinase activity in root tips of *Poncirus trifoliata* L. // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 71. P. 247. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.07.023>
  29. Wu Q., Zhang C., Yang H., Hu J., Zou L. *In vitro* propagation via organogenesis and formation of globular bodies of *Salvia plebeia*: a valuable medicinal plant // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2022. V. 58. P. 51. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10223-y>
  30. Zhang G., Su W. *In vitro* rapid propagation from young leaf of *Sinophropteris delavayi* (Franch.) Mickel. // J. Yunnan Univ. Nat. Sci. 2002. V. 24. P. 234. <http://www.yndxxb.ynu.edu.cn/yndxxbzkxb/article/id/1328>
  31. Amaki W., Kadokura S. Micropropagation of *Diplazium nipponicum* // Proc. of the International Plant Propagators Society. 2009. V. 59. P. 123.
  32. Chan-Sanchez T.J., Villanueva-Couoh E., Pinzon-Lopez L., Cristobal-Alejo J. Micropropagation of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott. // XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancun, Mexico. 2013. <https://smbb.mx/congresos%20smbb/cancun13/TRABAJOS/SMBB/BiotecnologiaAgricolaVegetal/II-O19.pdf>
  33. Li X., Fang Y.H., Han J.D., Bai S.N., Rao G.Y. Isolation and characterization of a novel somatic embryogenesis receptor kinase gene expressed in the fern *Adiantum capillus-veneris* during shoot regeneration *in vitro* // Plant Mol. Biol. Rep. 2015. V. 33. P. 638. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0769-2>
  34. Li X., Han J.D., Fang Y.H., Bai S.N., Rao G.Y. Expression analyses of embryogenesis-associated genes during somatic embryogenesis of *Adiantum capillus-veneris* L. *in vitro*: new insights into the evolution of reproductive organs in land plants // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 658. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00658>
  35. Fernandez H., Bertrand A.M., Schez-Tames R. Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 1996. V. 44. P. 261. <https://doi.org/10.1007/BF00048534>
  36. Kromer K., Raj A., Zolnierz L., Poturala D. Propagation *in vitro* and *ex situ* cultivation of *Woodsia alpina* (Bolton) // Club Mosses, Horsetails and Ferns in Poland – Resources and Protection / S.F. Gray. Polish Botanical Society Institute of Plant Biology, University of Wroclaw. 2008. P. 15.
  37. Shin S.L., Cheol H.L. Effect of medium components and culture methods on shoots regeneration from *Athyrium niponicum* // Korean J. Plant Res. 2011. V. 24. P. 113. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2011.24.2.113>
  38. Li T., Xu L., Li Z., Panis B. Cryopreservation of *Neotopteris nidus* prothallus and green globular bodies by droplet-vitrification // Cryo-Lett. 2013. V. 34. P. 481.
  39. Pence V.C. Propagation and cryopreservation of *Asplenium scolopendrium* var. *americanum*, the American hart's-tongue fern // Am. Fern J. 2015. V. 105. P. 211. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-105.3.211>
  40. Fernandez H., Bertrand M., Schez-Tames R. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizomes // Sci. Hortic. 1997. V.68. P. 243. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00986-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00986-7)
  41. Bertrand A.M., Albuerne M.A., Fernandez H., Gonzalez A., Sanchez Tames R. *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 1999. V. 57. P. 65. <https://doi.org/10.1023/A:1006348628114>
  42. Prematilake D.P., Nanayakkara N.H.A.G.R., Hettiarachchi A. Rapid propagation of *Nephrolepis* fern via tissue culture of runner tips // Ann. Sri Lanka Depart. Agric. 2004. V. 6. P. 321. <http://doan.nsf.ac.lk/handle/1/2077>

43. Liao Y.K., Cheng C.T. Using homogenized green globular body in tissue culture propagation of *Platycerium willinckii* T. Moore and *Platycerium grande* J. Sm. // Crop, Environ. Bioinf. 2018. V. 15. P. 169.  
[https://doi.org/10.30061/CEB.201809\\_15\(3\).0003](https://doi.org/10.30061/CEB.201809_15(3).0003)
44. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
45. Raine C.A., Sheffield E. Establishment and maintenance of aseptic culture of *Trichomanes speciosum* gametophytes from gemmae // Am. Fern J. 1997. V. 87. P. 87.  
<https://doi.org/10.2307/1547268>
46. Iuchi M., Goto A., Kawamura H. Micropropagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. through tissue culture, II: Induction of green globular bodies and regeneration of plantlets. // Tokushima Agric. Exp. Stat. Rep. (Japan). 1999. V. 35. P. 14.
47. Yu R., Li Y., Li D., Zhan X., Shi L. Radiosensitivity of green globular bodies of *Matteuccia struthiopteris* exposed to  $^{60}\text{Co}\gamma$  radiation // Chin. Bull. Bot. 2015. V. 50. P. 565.  
<https://doi.org/10.11983/CBB14141>
48. Wang D., Li Y., Li D., Shi L. Green globular body (GGB) induction and differentiation in the medicinal fern *Drynaria roosii* // BMC Plant Biology. 2021.  
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-409651/v1>
49. Yu R., Wang D., Li D., Zhan X., Shi L. Radiation breeding of Boston Fern via  $^{60}\text{Co}\gamma$  rays. // Acta Horticulturae Sinica. 2018. V. 45. P. 988.  
<https://www.ahs.ac.cn/EN/Y2018/V45/I5/988>

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ 9-ЦИС-ЭПОКСИКАРОТИНОИД-ДИОКСИГЕНАЗ *SLNCED1* И *SLNCED2* В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ И СОЗРЕВАНИЯ ПЛОДА ТОМАТА

© 2023 г. Г. И. Ефремов<sup>а</sup>\*, А. А. Ашихмин<sup>б</sup>, А. В. Щенникова<sup>а</sup>, Е. З. Кочиева<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>б</sup> Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение

Федерального исследовательского центра “Пушкинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук”, Пушкино, Россия

\*e-mail: [gleb\\_efremov@mail.ru](mailto:gleb_efremov@mail.ru)

Поступила в редакцию 08.09.2022 г.

После доработки 12.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Томат *Solanum lycopersicum* L. является важной сельскохозяйственной культурой и, одновременно, моделью для изучения онтогенеза сочного плода. Решающую роль в созревании плода играет абсцизовая кислота, которая образуется в результате окислительного расщепления эпоксикаротиноидов 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназами NCED. В работе определены профили экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2* и содержание каротиноидов в плодах на разных стадиях развития у трех сортов томата с различной окраской спелого плода. Показано, что транскрипты обоих генов присутствуют во всех органах. Уровень транскриптов *SINCED1* в ~4–6 раз выше уровня транскриптов *SINCED2*; пик активности *SINCED1* приходится на поздние стадии созревания, *SINCED2* – на начальный этап. Спелые плоды характеризуются наибольшей суммой каротиноидов; ликопин обнаружен только в плодах поздних стадий у красноплодных сортов, наибольшее содержание β-каротина – в спелых плодах желтоплодного сорта. Предшественник абсцизовой кислоты, виолаксантин, присутствует только в незрелом плоде; другой предшественник, неоксантин, убывает по мере созревания и на стадии спелости отсутствует. У красноплодных сортов обнаружена взаимосвязь уровня транскриптов *SINCED1* и *SINCED2* с содержанием β-каротина. Полученные данные предполагают совместное участие *SINCED1* и *SINCED2* в биосинтезе абсцизовой кислоты в процессе развития и созревания плода томата. При этом ключевая роль принадлежит гену *SINCED1*, пик активности которого приходится на этап смены окраски плода. Более низкие уровни транскриптов *SINCED2* и его пик активности на ранних стадиях развития плода предполагает разделение функций NCED между двумя ферментами.

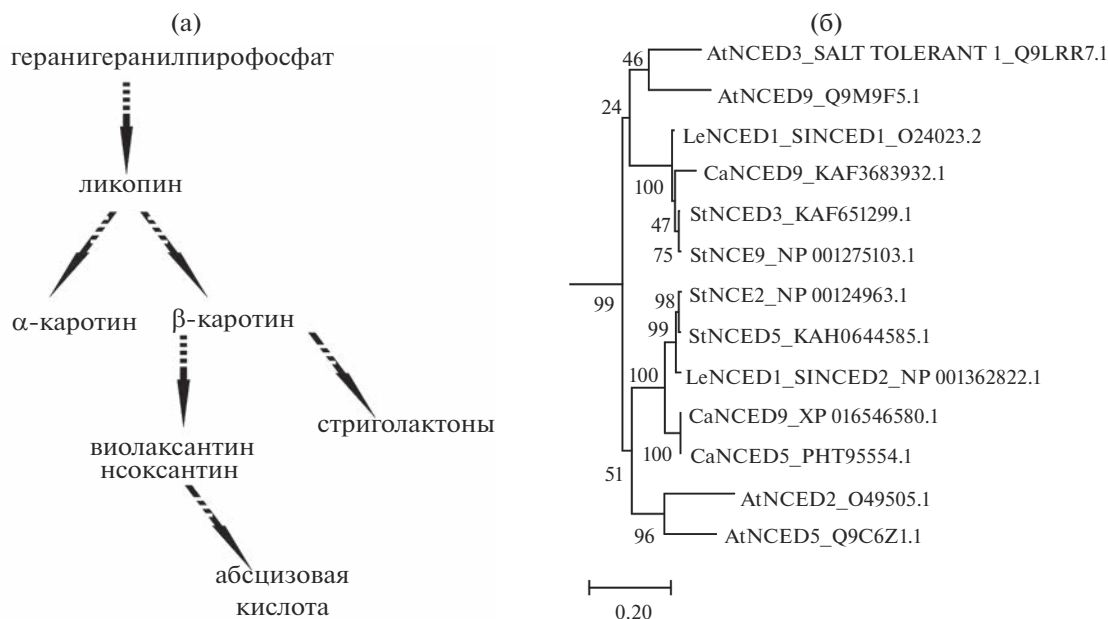
**Ключевые слова:** *Solanum lycopersicum*, биосинтез каротиноидов, каротиноид-расщепляющие оксигеназы, созревание плода томата, томат, NCED

**DOI:** 10.31857/S0015330322600504, **EDN:** GKUXSW

### ВВЕДЕНИЕ

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) является важной сельскохозяйственной культурой, формирующей сочные, мясистые плоды (ягоды), которые являются ценным источником витаминов А и С, ликопина и других важных микроэлементов и антиоксидантных соединений. Помимо этого, томат используется в качестве модельного объекта для изучения онтогенеза сочного плода, в том числе благодаря секвенированному и аннотированному геному, многообразию сортов и наличию родственных дикорастущих видов (секция *Lycopersicon* рода *Solanum*) [1, 2]. Онтогенез сочного плода представляет собой сложный генети-

ческий процесс, который сопровождается наработкой аттрактантов, а именно, изменениями окраски, вкуса, аромата и текстуры, что ассоциировано с накоплением транскриптов соответствующих генов [3–6]. С помощью транскриптомных, метаболомных, протеомных и эпигеномных исследований были идентифицированы основные факторы, под действием которых осуществляется созревание плода *S. lycopersicum* [3–6]. Очень значительным оказался вклад каротиноидов, содержание и состав которых определяет окраску спелой ягоды (различные оттенки желто-красного спектра) [4, 7, 8]. Более того, производными каротиноидов являются крайне важные для репро-



**Рис. 1.** Участок пути биосинтеза каротиноидов в тканях растения, приводящий к образованию апокаротиноидов SLs и АБК (а). Дендрограмма на основе аминокислотных последовательностей гомологов NCED *S. lycopersicum* (SINCED), *A. thaliana* (AtNCED), *S. tuberosum* (StNCED) и *C. annuum* (CaNCED) в программе MEGA 7.0 (метод Maximum Likelihood; 1000 бутстреп-реplik); рядом с каждым названием белка указаны синонимичное название и NCBI ID. Длина ветвей оценивается в генетической дистанции (число замещений на сайт; указано под дендрограммой) (б).

дуктивного развития растения апокаротиноиды, такие фитогормоны, как стриголактоны (strigolactones; SLs), абсцизовая кислота (АБК) и другие соединения. Все они синтезируются за счет окислительного расщепления каротиноидов-предшественников, опосредованного семейством ферментов негемового железа — каротиноид-расщепляющими оксигеназами [9, 10].

Так, при расщеплении  $\beta$ -каротина каротиноид-расщепляющими диоксигеназами (CCD) образуются SLs (рис. 1а), которые играют роль сигнальных молекул ризосферы (в том числе в ответ на стрессы), а также ингибиторов ветвления побега [9, 10]. Возможность участия данных фитогормонов в репродуктивном развитии растения продемонстрирована на примере земляники *Fragaria vesca*: большинство генов биосинтеза SLs имеют высокие уровни транскриптов в плодolistиках и низкие (или нулевые) в зреющих плодах [11]. На примере томата показано, что при активном участии гена *LeCCD1B* происходит синтез важных летучих ароматических соединений в спелом плоде [12], а снижение уровня транскриптов гена *SICCD8* приводит к формированию более мелких цветков, плодов и семян [13].

Гормон АБК образуется в результате окислительного расщепления эпоксикаротиноидов (неоксантин и виолаксантин) (рис. 1а) [10, 14] и играет решающую роль в созревании и старении плодов, как климактерических (томат), так и неклимакте-

рических (например, перец *Capsicum annuum* L.) [5]. Ключевыми ферментами пути биосинтеза АБК являются 9-*цис*-эпоксикаротиноид-диоксигеназы (NCED) [10], которые охарактеризованы у различных видов растений, в том числе образующих сочные ягоды [14–17]. Показано, что именно индукция синтеза АБК под воздействием активированных NCED является критическим для инициации созревания, тогда как роль этилена ограничена более поздними стадиями [17]. Более того, повышение уровня АБК приводит к усилению биосинтеза этилена посредством положительной регуляции экспрессии генов ацетил-СоА синтазы *ACS* и оксидазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты *ACO* [17].

У томата детально охарактеризовано участие одного из генов группы *NCED* — *SINCED1* (или *LeNCED1*), в процессе развития плода. Определено, что биосинтез АБК в начале созревания иницируется после активации экспрессии гена *SINCED1*, что предшествует индукции этиленопосредуемого созревания [17]. Также, показано, что *SINCED1* играет решающую роль в регуляции развития пестика и завязывания плода [18]. Конститутивная сверхэкспрессия гена *SINCED1* приводит к значительному росту концентрации АБК в тканях, увеличению количества партенокарпических плодов, а также снижает потерю биомассы побегов и корней в ответ на солевой стресс [18, 19]. Более того, различия в уровне

экспрессии *SINCE1* и, соответственно, в содержании АБК, определяют степень солеустойчивости генотипов томата [20]. Ожидается, выключение экспрессии гена *SINCE1* в растениях томата приводит к снижению накопления АБК и росту содержания вышестоящих соединений каротиноидного пути, в основном ликопина и  $\beta$ -каротина, и как следствие, к более насыщенной красной окраске плодов [21].

Что касается другого гена группы – *SINCE2* (*LeNCE2*), то в исследованиях описаны только некоторые особенности его экспрессии. Показано, что в листьях томата с нуль-мутацией *notabilis* в гене *SINCE1* уровень транскриптов гена *SINCE2* не меняется, несмотря на то, что содержание АБК остается таким же, как в растении дикого типа, из чего сделан вывод, что в мутантном растении *SINCE2* не принимает участия в биосинтезе АБК [22]. Также, на уровень экспрессии *SINCE2* не влияет повышенный уровень  $\text{CO}_2$  и тепловой стресс [23], однако обезвоживание незначительно активирует транскрипцию *SINCE2* в корнях растения, при том, что экспрессия *SINCE1* возрастает существенно [24].

В данной работе определены профили экспрессии генов 9-*cis*-эпоксикаротиноид-диоксигеназ *SINCE1* и *SINCE2*, а также содержание каротиноидов в плодах на разных стадиях созревания у сортов томата *S. lycopersicum*. Проведена оценка возможной корреляции уровней транскриптов *SINCE1* и *SINCE2* с количеством накапливаемого ликопина,  $\beta$ -каротина и суммой каротиноидов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы трех сортов томата овощного (*S. lycopersicum*) – Heinz, Корнеевский и Копилка желтая, спелый плод которых имеет красную, малиновую и желтую окраску, соответственно. Растения выращивали до плодоношения в 2021 г. в условиях пленочной теплицы ФГБНУ “Федеральный научный центр овощеводства” (ФНЦО, Московская область, РФ) и далее содержали в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН).

В августе-сентябре 2021 г. для каждого сорта в двух биологических повторах были отобраны образцы плодов (кожица и мякоть вместе) на четырех стадиях развития/созревания. А именно: незрелые зеленые плоды (immature green, IG); зрелые зеленые плоды финального размера (mature green, MG); зрелые плоды с признаками изменения окраски (breaker, BR); спелые плоды с финальной окраской (fully ripe, FR). Ткань растирали в жидком азоте и хранили при  $-80^\circ\text{C}$ .

Образцы (50–100 мг) были использованы для анализа генной экспрессии. Для этого из них выделяли (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Германия) и очищали от примесей геномной ДНК (RNase free DNasy set; Qiagen, Германия) суммарную РНК, которую использовали как матрицу для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System; Promega, США) по протоколам производителей. Качество РНК оценивали методом электрофореза в 1.5% агарозном геле. Аликвоты РНК и кДНК обрабатывали с помощью наборов Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США), затем определяли концентрацию препаратов на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Последовательности *SINCE1* (синоним *LeNCE1*; *NCE1* 9-*cis*-эпоксикаротиноид dioxygenase; Gene ID: 544163; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Solyc07g056570>, <https://www.solgenomics.net/>) и *SINCE2* (синоним *LeNCE2*; *NCE2* 9-*cis*-эпоксикаротиноид dioxygenase 2; Gene ID: 100316877; Solyc08g016720) *S. lycopersicum* использовали при разработке праймеров для анализа экспрессии данных генов: 5'-TTAGATGCTGTAGAAGTGCTT-3'/5'-ATATTCTAAACCATCCCTCTGG-3' (*SINCE1*) и 5'-TATGCCCCGTGGAGTTTTTCGG-3'/5'-GTTTGAAGATCGCCAGAAGGCAA-3' (*SINCE2*).

Количественную ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) проводили в двух биологических и трех технических повторах на термоциклере CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Для подготовки проб использовали 3 нг кДНК-матрицы и набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green I и ROX” (ЗАО Синтол, Москва, Россия). Условия проведения реакции, следующие:  $95^\circ\text{C}$  – 5 мин.; 40 циклов ( $95^\circ\text{C}$  – 15 с,  $60^\circ\text{C}$  – 40 с). Данные генной экспрессии нормализовали по референсным генам томата *Expressed* и *ACTIN2* [25] и статистически обрабатывали с помощью пакета программ Graph Pad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Данные выражали как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) на основе двух биологических и трех технических повторов. Для оценки различий в экспрессии генов применяли Т-критерий Велча (unequal variance (Welch’s) *t*-test) ( $P < 0.05$  указывает на статистическую значимость различия). Линейные регрессии экспрессии генов и содержания каротиноидов, а также квадрат коэффициентов множественной корреляции ( $R^2$ ) рассчитывали в программе GraphPad Prism v. 8. Корреляцию считали строго подтвержденной, предположительной или отсутствующей, если  $R^2 > 0.7$ ,  $R^2 = 0.4–0.7$  или  $R^2 < 0.4$  соответственно (при  $P < 0.001$ ).

*In silico* анализ экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2* проводили с использованием данных базы TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>).

Структурно-филогенетический анализ проводили, используя пакет программ MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>; метод Maximum Likelihood; 1000 бутстреп-реплик).

Биохимический анализ содержания (мг/г сырого веса) ликопина,  $\beta$ -каротина и суммы каротиноидов в тканях плода (4 стадии развития/созревания) всех анализируемых образцов томата проводили с использованием модифицированного протокола метода Фолча [25, 26] в двух биологических и трех технических повторах. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия).

Относительное содержание (% от суммы каротиноидов) виолаксантина и неоксантина в тканях плода (4 стадии развития/созревания) двух образцов томата проводили с помощью ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) системы Shimadzu (Shimadzu, Киото, Япония) при 22°C, как было описано ранее [27, 28]. Каротиноиды идентифицировали по их времени удержания и спектрам поглощения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Структура и профиль экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2*

Проведенный структурно-филогенетический анализ показал, что гены *SINCED1* и *SINCED2* являются безинтронными и идентичны друг другу на 74% (на белковом уровне – 71%). Белки *SINCED1* и *SINCED2* содержат консервативный домен, характерный для 9-cis-эрохусаротеноид дioxугеназы NCED (PLN02258) и на дендрограмме входят в состав сестринских групп одного кластера (рис. 16).

Проведен *in silico* анализ экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2* в растении томата, где использованы данные транскриптомов по сортам *S. lycopersicum* (SUN1642, M82, Rutgers, Heinz 1706, Micro-Tom, Moneymaker и Alisa Craig) и дикорастущему красноплодному виду томата *S. pimpinellifolium* L. (LA1589). Показано, что профили экспрессии генов сходны между собой, при этом транскрипты обоих генов присутствуют во всех тканях и органах (корни, листья, меристемы, цветки, плоды) (рис. 2а, б). Однако уровень транскриптов *SINCED1* значительно выше (в ~4–6 раз), чем уровень транскриптов *SINCED2*. При этом наибольшая экспрессия *SINCED1* приходится на стадии созревания плода MG, BR и FR (рис. 2а), а *SINCED2* – на стадию IG (рис. 2б).

С учетом полученного *in silico* профиля экспрессии генов, для РВ-ПЦР были взяты ткани плода на 4 стадиях развития/созревания (IG, MG, BR

и FR) трех исследуемых сортов (Heinz, Корнеевский и Копилка желтая) (рис. 3а).

Проведенный анализ экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2* у исследуемых сортов томата подтвердил *in silico* данные, касающиеся разницы в уровне транскриптов (рис. 3б, в).

Пик экспрессии гена *SINCED1* соответствовал стадии BR, связанной со сменой зеленой окраски плода на желтую (Копилка желтая) или красную (Heinz, Корнеевский), после чего экспрессия гена резко падала (Heinz, Копилка желтая) (рис. 3б). У сорта Корнеевский максимум экспрессии *SINCED1* сохранялся и на стадии FR (рис. 3б). Возможно, это объясняется тем, что плоды, собранные, руководствуясь визуальными данными, на стадии биологической спелости, еще полностью не завершили этап смены окраски. Это подтверждается недостаточно глубоким цветом (красным, но не малиновым) плодов FR сорта Корнеевский (рис. 3а).

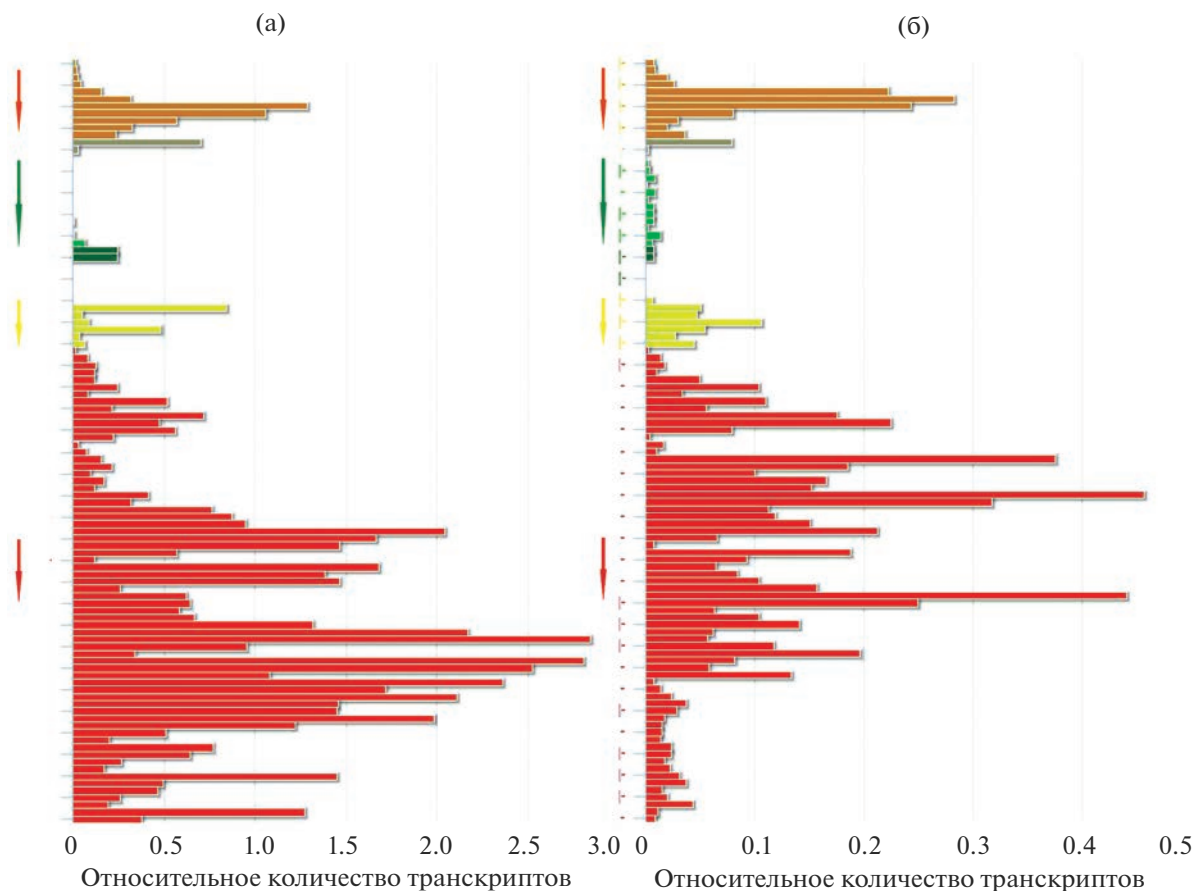
Наиболее высокий уровень транскриптов *SINCED2* обнаружен в плодах стадии IG (Копилка желтая, Корнеевский) и MG (Heinz). Среди сортов самая высокая экспрессия гена *SINCED2* наблюдалась у сорта Копилка желтая (IG), самая низкая – у сорта Корнеевский (рис. 3в).

### Уровень транскриптов генов *SINCED1* и *SINCED2* коррелирует с содержанием $\beta$ -каротина в плоде томата

Поскольку предшественниками АБК являются производные  $\beta$ -каротина – виолаксантин и неоксантин, для изучения выбраны образцы сортов томата, различающиеся окраской спелого плода (рис. 3а). Анализ содержания ликопина,  $\beta$ -каротина и суммы каротиноидов ( $x + c$ ) проведен в плодах (вместе кожица и мякоть) на 4 стадиях развития/созревания (IG, MG, BR, FR).

Согласно полученным данным, наибольшими значениями суммы каротиноидов характеризуются спелые плоды анализируемых сортов: резкое накопление происходит между стадиями BR и FR (рис. 4а). Содержание ликопина и  $\beta$ -каротина различалось между сортами. Ликопин обнаружен только в плодах стадий BR и FR красноплодных сортов Heinz и Корнеевский; плоды желтоплодного сорта Копилка желтая ликопина не содержали (рис. 4б). При этом количество  $\beta$ -каротина сходно на всех стадиях в плодах сорта Heinz и в плодах стадий IG и MG двух других сортов. В плодах стадий BR и FR сортов Корнеевский и Копилка желтая содержание  $\beta$ -каротина существенно возрастало – в ~1.5–2 и ~5–6 раз, соответственно (рис. 4в).

Проведена оценка зависимости содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2*. Согласно полученным данным, кор-



**Рис. 2.** Относительный уровень транскриптов генов *SINCED1* (Gene ID: 544163) (а) и *SINCED2* (Gene ID: 100316877) (б) в различных органах образцов томата *S. lycopersicum*. Построено *in silico* по данным базы TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/login>). Направление стрелки (слева от каждого графика) соответствует поступательному развитию соответствующего органа. Экспрессия генов в разных органах обозначена цветом: корень – серым, лист – зеленым, мериistema побега – салатовым, цветок – желтым, плод – красным, семена – коричневым.

реляция с количеством суммы каротиноидов и ликопина отсутствует для всех сортов. Для красноплодных сортов Heinz и Корнеевский обнаружена статистически значимая взаимосвязь уровня транскриптов *SINCED1* и содержания  $\beta$ -каротина (рис. 5а); в случае *SINCED2* корреляция менее выражена, однако тоже статистически возможна (рис. 5б). Для желтоплодного сорта Копилка желтая такие связи отсутствуют (рис. 5а, б). Интересно, что обнаруженные корреляции являются обратными (чем выше уровень транскриптов гена, тем ниже содержание  $\beta$ -каротина), за исключением положительной взаимосвязи *SINCED1*- $\beta$ -каротин в плодах сорта Корнеевский (рис. 5а), возможно, из-за несоответствия плода FR стадии биологической спелости.

Для уточнения количества непосредственных предшественников АБК проведен дополнительный анализ содержания виолаксантина и неоксантина в плодах на четырех стадиях развития у образцов двух сортов томата – красноплодного Heinz и желтоплодного Копилка желтая. Обнару-

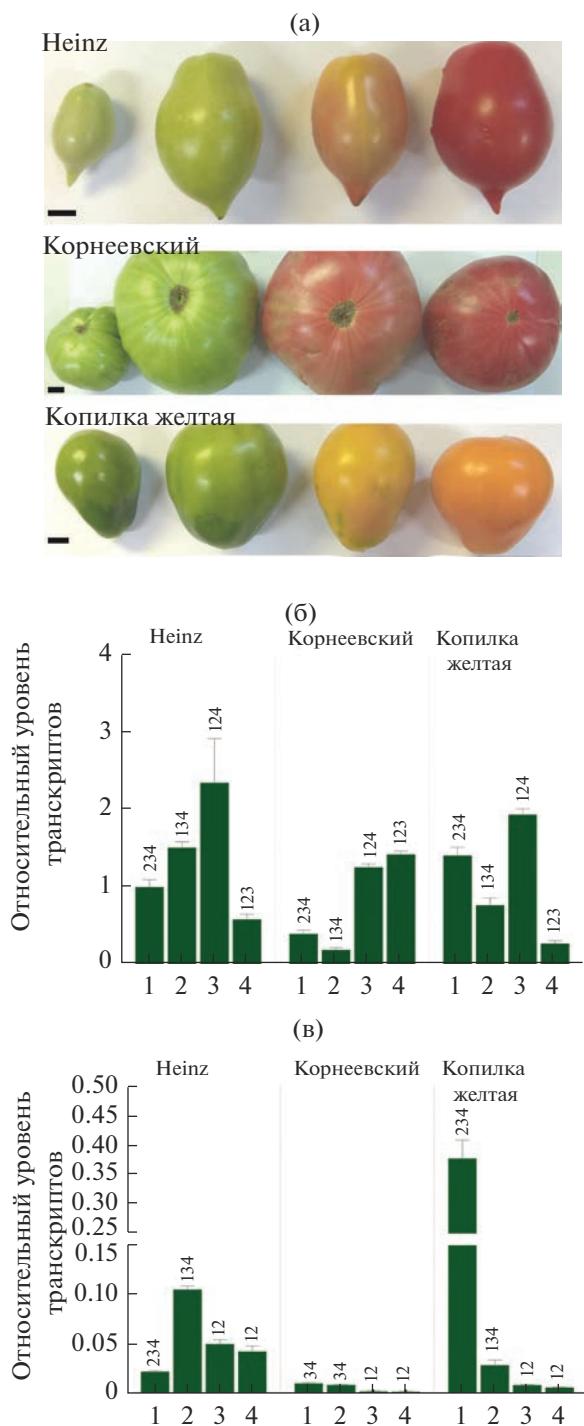
жено, что плоды обоих сортов содержат виолаксантин только на стадии IG, причем у сорта Копилка желтая в ~3 раза выше (по отношению к сумме каротиноидов), чем у сорта Heinz. Наибольшим содержанием неоксантина характеризовались плоды стадий IG (Heinz) и MG (Копилка желтая); на стадии BR неоксантин присутствовал в следовых количествах, а на стадии FR – отсутствовал у всех сортов (табл. 1).

## ОБСУЖДЕНИЕ

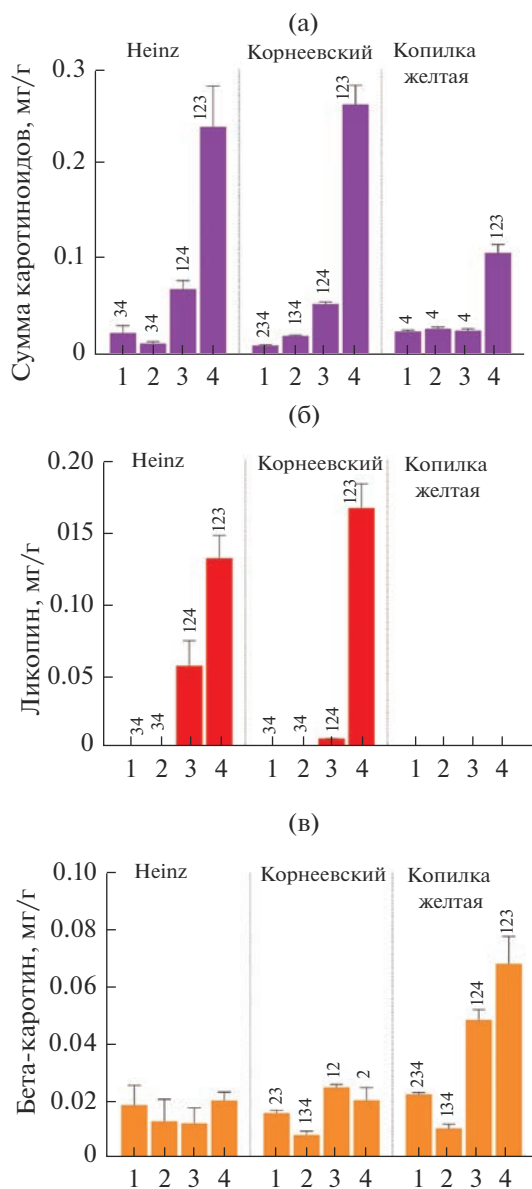
В данном исследовании проведена оценка возможной корреляции активности генов 9-цис-эпоксикаротиноид-расщепляющих деоксигеназ *SINCED1* и *SINCED2* с содержанием и составом каротиноидов в развивающемся плоде томата.

Согласно данным филогенетического анализа (рис. 16), *SINCED1* входит в кластер, образуемый белками *A. thaliana* AtNCED3 и AtNCED9, тогда как *SINCED2* – в кластер, образуемый AtNCED2 и AtNCED5. Структурная гомология может сви-



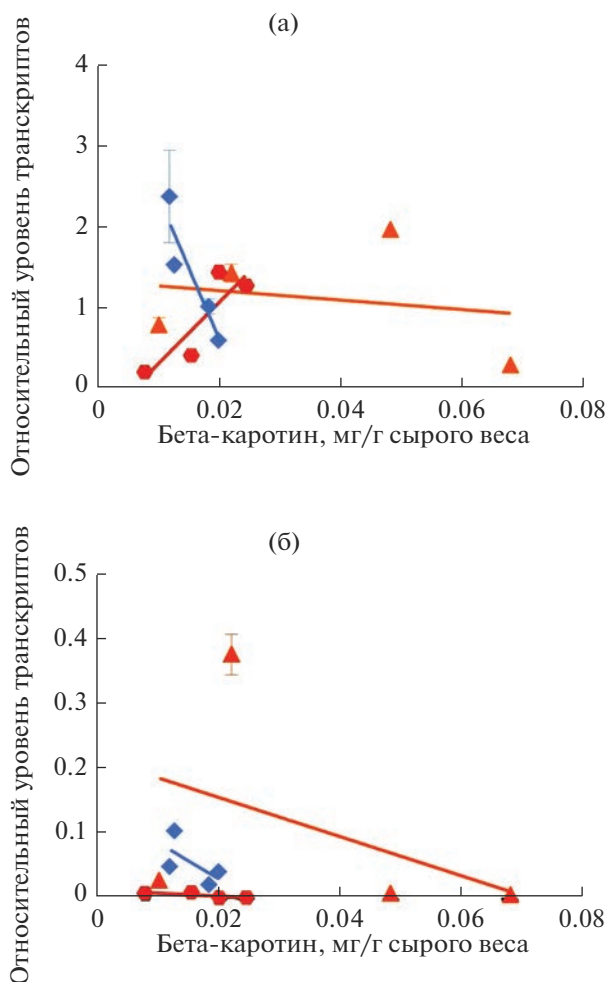


**Рис. 3.** Фотографии плодов анализируемых сортов томата: слева направо плоды соответствуют стадиям развития/созревания IG, MG, BR и FR; масштабная линия = 1 см (а). Относительный уровень транскриптов генов *SINCED1* и *SINCED2* в плодах анализируемых образцов томата на четырех стадиях развития/созревания IG (1), MG (2), BR (3) и FR (4); цифрами над столбиками обозначены статистически достоверные отличия экспрессии генов между стадиями развития плода одного образца ( $P < 0.05$ ) (б).



**Рис. 4.** Содержание (мг/г свежей массы) суммы каротиноидов (а), ликопина (б) и  $\beta$ -каротина (в) в плодах анализируемых образцов томата на четырех стадиях развития/созревания IG (1), MG (2), BR (3) и FR (4). Цифрами над столбиками обозначены статистически достоверные отличия содержания каротиноидов между стадиями развития плода одного образца ( $P < 0.05$ ).

детельствовать о сходстве функций диоксигеназ. Известно, что *AtNCED2* и *AtNCED3* отвечают за активность *NCED* в корнях, *AtNCED2*, *AtNCED3* и *AtNCED5* — в развивающихся пыльниках, а *AtNCED3*, *AtNCED5* и *AtNCED9* — в зародыше и эндосперме развивающихся семян, включая индукцию состояния покоя [29, 30]. Кроме того, *AtNCED3* вместе с *AtNCED5* участвуют в ответе растений на обезвоживание [30, 31]. Можно предположить, что *SINCED1*, кроме показанной ранее роли в развитии пестика и завязывании плода, а



**Рис. 5.** Оценка корреляции между содержанием β-каротина и относительным уровнем транскриптов генов *SINCED1* (а) и *SINCED2* (б). Линейная регрессия выполнена в разном цвете, в зависимости от сорта: синим – Heinz; красным – Корнеевский; желтым – Копилка желтая. В случае гена *SINCED1* коэффициенты, следующие:  $R^2 = 0.8515$  (Heinz),  $R^2 = 0.7736$  (Корнеевский),  $R^2 = 0.0437$  (Копилка желтая). В случае гена *SINCED2* коэффициенты, следующие:  $R^2 = 0.4028$  (Heinz),  $R^2 = 0.6186$  (Корнеевский),  $R^2 = 0.1889$  (Копилка желтая).

также в определении устойчивости к солевому стрессу и обезвоживанию [18–20, 24], может, подобно своим гомологам *AtNCED3* и *AtNCED9*, участвовать в процессе формирования пыльников и семян томата. Для *SINCED2* с показанной ранее слабой индукцией в корнях в ответ на обезвоживание [24] можно с учетом гомологии с

*AtNCED2* и *AtNCED5* предположить также причастность к АБК-опосредованному развитию пыльников и семян.

Профиль экспрессии генов *SINCED1* и *SINCED2*, определенный *in silico* (рис. 2а, б), указывает на функционирование обоих генов и в вегетативных (корень, лист, меристема), и в репродуктивных

**Таблица 1.** Содержание неоксантина и виолаксантина в плодах томата на разных стадиях развития/созревания

| Каротиноид         | Содержание каротиноида, % от суммы каротиноидов |     |     |     |                     |      |     |     |
|--------------------|---|-----|-----|-----|---------------------|------|-----|-----|
|                    | Сорт Heinz                                      |     |     |     | Сорт Копилка желтая |      |     |     |
|                    | IG  | MG  | BR  | RR  | IG                  | MG   | BR  | RR  |
| (all-E) Неоксантин | 6.9   | 0.9 | 0.7 | 0.0 | 22.1                | 8.8  | 0.4 | 0.0 |
| (9'Z) Неоксантин   | 16.3  | 4.7 | 1.0 | 0.0 | 0.0                 | 39.4 | 0.4 | 0.0 |
| Виолаксантин       | 11.0  | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 27.6                | 0.0  | 0.0 | 0.0 |

(цветок, плод, семена) тканях. Это косвенно подтверждает предположения об участии обоих генов в развитии семян, а также говорит о совместном участии генов в регуляции биосинтеза АБК во всем растении томата. Существенное превышение уровня транскриптов *SINCE1* по сравнению с *SINCE2* (рис. 2а, б) может свидетельствовать о ключевой роли *SINCE1* и вспомогательной функции *SINCE2* в окислительном расщеплении каротиноидов до АБК.

Это согласуется с данными, полученными ранее для *Prunus persica* L. [32]. Было показано, что в плодах персика биосинтез АБК находится под совместным контролем двух изоферментов, PpNCED1 и PpNCED5, гены которых имеют схожие профили транскрипции, причем PpNCED5 транскрибируется ниже, чем PpNCED1 [32]. Более того, пространственно-временная экспрессия и транскрипционная реакция генов на абиотические стрессы предполагают функциональное расхождение между PpNCED1 и PpNCED5 [32]. Обнаруженные различия в динамике экспрессии генов томата *SINCE1* и *SINCE2* (рис. 2а, б) также указывают на возможное разделение функций NCED между генами. Это подтверждается результатами РВ-ПЦР, согласно которым пики активности *SINCE1* и *SINCE2* приходятся на разные стадии – смены окраски (BR) и незрелого зеленого плода (IG/MG) соответственно (рис. 3б, в).

Полученные данные биохимического анализа подтвердили зависимость окраски плода (рис. 1а) от содержания и состава пигментов (рис. 4а–в). Так, красная и малиново-красная окраска плодов сортов Heinz и Корнеевский соответствует большому количеству ликопина в спелом плоде, а желтая окраска плодов сорта Копилка желтая объясняется отсутствием ликопина и присутствием высокой концентрации β-каротина (рис. 4б, в).

Обнаруженная зависимость уровня транскриптов *SINCE1* и *SINCE2* от содержания β-каротина (рис. 5а, б) предполагает, что количество каротиноидов-предшественников АБК может выполнять роль индуктора генов NCED. Разницу между суммой каротиноидов и ликопином + β-каротин, составляют, по всей видимости, α-каротин, а также ксантофиллы, к которым относятся производные β-каротина – виолаксантин и неоксантин, являющиеся предшественниками АБК (рис. 1а). Данные ВЭЖХ анализа показали, что спелые плоды сортов Heinz и Копилка желтая не содержат непосредственных предшественников АБК – виолаксантина и неоксантина (табл. 1). При этом их высокое содержание на начальных стадиях развития/созревания плода (табл. 1) согласуется со снижением уровня транскриптов *SINCE1* и *SINCE2* (рис. 3б, в), а также с ролью АБК как индуктора созревания, которая на более поздних стадиях переходит к этилену [17].

Таким образом, полученные данные предполагают совместное участие *SINCE1* и *SINCE2* в биосинтезе АБК в процессе развития/созревания плода томата. При этом ключевая роль принадлежит гену *SINCE1*, пик активности которого приходится на этап смены окраски плода. В то же время более низкие уровни транскриптов *SINCE2* и пик активности данного гена на более ранних стадиях развития плода предполагает разделение функций NCED между двумя ферментами. Обнаруженная взаимосвязь уровня транскриптов *SINCE1* и *SINCE2* с содержанием β-каротина может свидетельствовать о роли предшественников АБК как индукторов экспрессии генов NCED.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19–16–00016 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li Y., Wang H., Zhang Y., Martin C. Can the world's favorite fruit, tomato, provide an effective biosynthetic chassis for high-value metabolites? // *Plant Cell Rep.* 2018. V. 37. P. 1443. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2283-8>
2. Peralta I.E., Spooner D.M. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae) // *Genetic improvement of Solanaceous crops.* 2007. V. 2. P. 1. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b10744-1/history-origin-early-cultivation-tomato-solanaceae-iris-peralta-david-spooner>
3. Slagina M.A. Transcription factor ripening inhibitor and its homologs in regulation of fleshy fruit ripening of various plant species // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 783. <https://doi.org/10.1134/S1021443721050186>
4. Karlova R., Chapman N., David K., Angenent G.C., Seymour G.B., de Maagd R.A. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 4527. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru316>
5. Kou X., Zhou J., Wu C.E., Yang S., Liu Y., Chai L., Xue Z. The interplay between ABA/ethylene and NAC TFs in tomato fruit ripening: a review // *Plant Mol. Biol.* 2021. V. 106. P. 223. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01128-w>
6. Fenn M.A., Giovannoni J.J. Phytohormones in fruit development and maturation // *Plant J.* 2021. V. 105. P. 446. <https://doi.org/10.1111/tpj.15112>
7. Osorio C.E. The role of orange gene in carotenoid accumulation: manipulating chromoplasts toward a colored future // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1235. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01235>

8. Chattopadhyay T., Hazra P., Akhtar S., Maurya D., Mukherjee A., Roy S. Skin colour, carotenogenesis and chlorophyll degradation mutant alleles: genetic orchestration behind the fruit colour variation in tomato // *Plant Cell Rep.* 2021. V. 40. P. 767. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02650-9>
9. López-Ráez J.A., Kohlen W., Charnikhova T., Mulder P., Undas A.K., Sergeant M.J., Verstappen F., Bugg T.D.H., Thompson A.J., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? // *New Phytol.* 2010. V. 187. P. 343. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03291.x>
10. Smolikova G.N., Medvedev S.S. Seed carotenoids: synthesis, diversity, and functions // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 1. <https://doi.org/10.1134/S1021443715010136>
11. Wu H., Li H., Chen H., Qi Q., Ding Q., Xue J., Ding J., Jiang X., Hou X., Li Y. Identification and expression analysis of strigolactone biosynthetic and signaling genes reveal strigolactones are involved in fruit development of the woodland strawberry (*Fragaria vesca*) // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. P. 73. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1673-6>
12. Simkin A.J., Schwartz S.H., Aldridge M., Taylor M.G., Klee H.J. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone // *Plant J.* 2004. V. 40. P. 882. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02263.x>
13. Kohlen W., Charnikhova T., Lammers M., Pollina T., Tóth P., Haider I., Pozo M.J., de Maagd R.A., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H.J., López-Ráez J.A. The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SICCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis // *New Phytol.* 2012. V. 196. P. 535. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04265.x>
14. Zhang M., Yuan B., Leng P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 1579. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp026>
15. Wang P., Lu S., Zhang X., Hyden B., Qin L., Liu L., Bai Y., Han Y., Wen Z., Xu J., Cao H., Chen H. Double NCED isozymes control ABA biosynthesis for ripening and senescent regulation in peach fruits // *Plant Sci.* 2021. V. 304. P. 110739. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110739>
16. Li C., Ma X., Huang X., Wang H., Wu H., Zhao M., Li J. Involvement of HD-ZIP I transcription factors LcHB2 and LcHB3 in fruitlet abscission by promoting transcription of genes related to the biosynthesis of ethylene and ABA in litchi // *Tree Physiol.* 2019. V. 39. P. 1600. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpz071>
17. Zhang M., Leng P., Zhang G., Li X. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits // *J. Plant Physiol.* 2009. V. 166. P. 1241. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.01.013>
18. Kai W., Fu Y., Wang J., Liang B., Li Q., Leng P. Functional analysis of SINCED1 in pistil development and fruit set in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // *Sci Rep.* 2019. V. 9. P. 16943. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52948-2>
19. Martínez-Andújar C., Martínez-Pérez A., Ferrández-Ayela A., Albacete A., Martínez-Melgarejo P.A., Dodd I.C., Thompson A.J., Pérez-Pérez J.M., Pérez-Alfocea F. Impact of overexpression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase on growth and gene expression under salinity stress // *Plant Sci.* 2020. V. 295. P. 110268. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110268>
20. Yang R., Yang T., Zhang H., Qi Y., Xing Y., Zhang N., Li R., Weeda S., Ren S., Ouyang B., Guo Y.D. Hormone profiling and transcription analysis reveal a major role of ABA in tomato salt tolerance // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 77. P. 23. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.015>
21. Sun L., Yuan B., Zhang M., Wang L., Cui M., Wang Q., Leng P. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of SINCED1 increases both lycopene and  $\beta$ -carotene contents in tomato fruit // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 3097. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers026>
22. Ntatsi G., Savvas D., Huntenburg K., Druerge U., Hincha D.K., Zuther E., Schwarz D. A study on ABA involvement in the response of tomato to suboptimal root temperature using reciprocal grafts with *notabilis*, a null mutant in the ABA-biosynthesis gene *LeNCED1* // *Environ. Exp. Bot.* 2014. V. 97. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.011>
23. Li X., Ahammed G.J., Zhang Y.Q., Zhang G.Q., Sun Z.H., Zhou J., Zhou Y.H., Xia X.J., Yu J.Q., Shi K. Carbon dioxide enrichment alleviates heat stress by improving cellular redox homeostasis through an ABA-independent process in tomato plants // *Plant Biol (Stuttg).* 2015. V. 17. P. 81. <https://doi.org/10.1111/plb.12211>
24. Muñoz-Espinoza V.A., López-Climent M.F., Casaretto J.A., Gómez-Cadenas A. Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 997. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00997>
25. Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential regulation of phytoene synthase *PSYI* during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants.* 2020. V. 9. P. 1169. <https://doi.org/10.3390/plants9091169>
26. Filyushin M.A., Dzhos E.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Dependence of pepper fruit colour on basic pigments ratio and expression pattern of carotenoid and anthocyanin biosynthesis genes // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 1054. <https://doi.org/10.31857/S0015330320050048>
27. Ashikhmin A., Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Incorporation of spheroidene and spheroidenone into

- light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria // *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 2017. V. 170. P. 99. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.020>
28. *Pashkovskiy P., Kreslavski V., Khudyakova A., Ashikhmin A., Bolshakov M., Kozhevnikova A., Kosobryukhov A., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I.* Effect of high-intensity light on the photosynthetic activity, pigment content and expression of light-dependent genes of photomorphogenetic *Solanum lycopersicum* hp mutants // *Plant Physiol. Biochem.* 2021. V. 167. P. 91. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.07.033>
29. *Tan B.C., Joseph L.M., Deng W.T., Liu L., Li Q.B., Cline K., McCarty D.R.* Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family // *Plant J.* 2003. V. 35. P. 44. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01786.x>
30. *Frey A., Effroy D., Lefebvre V., Seo M., Perreau F., Berger A., Sechet J., To A., North H.M., Marion-Poll A.* Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members // *Plant J.* 2012. V. 70. P. 501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04887.x>
31. *Behnam B., Iuchi S., Fujita M., Fujita Y., Takasaki H., Osakabe Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Kobayashi M., Shinozaki K.* Characterization of the promoter region of an *Arabidopsis* gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in dehydration-inducible transcription // *DNA Res.* 2013. V. 20. P. 315. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst012>
32. *Wang P., Lu S., Zhang X., Hyden B., Qin L., Liu L., Bai Y., Han Y., Wen Z., Xu J., Cao H., Chen H.* Double NCED isozymes control ABA biosynthesis for ripening and senescent regulation in peach fruits // *Plant Sci.* 2021. V. 304. P. 110739. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110739>

УДК 581.1

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА СТЕРИНОВ ЭМБРИОГЕННЫХ И НЕЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB<sup>1</sup>

© 2023 г. Н. В. Семёнова<sup>а</sup>, \*, В. Н. Шмаков<sup>а</sup>, Ю. М. Константинов<sup>а</sup>, Л. В. Дударева<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

\*e-mail: tashasemyonova@mail.ru

Поступила в редакцию 09.09.2022 г.

После доработки 09.09.2022 г.

Принята к публикации 09.09.2022 г.

С помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии проведен сравнительный анализ качественного и количественного составов стериновых компонентов в тканях клеточных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) с разным эмбрионным потенциалом. Обнаружены существенные межлинейные различия в качественном и количественном содержании фракций свободных стеринов и эфиров стеринов. Наряду со стериновыми компонентами обнаружен сквален – тритерпен, являющийся промежуточным соединением в биосинтезе стеринов. Доминирующими свободными стеринами эмбрионных клеточных линий были  $\beta$ -ситостерин, кампестерин, изофукостерин и стигмастерин, а неэмбрионных линий –  $\beta$ -ситостерин, кампестерин и стигмастерин. При этом содержание кампестерина в эмбрионных линиях было в 1.3–1.9 раза выше, чем в неэмбрионных. Поскольку кампестерин является предшественником brassinosteroidов, логично предположить, что его высокое содержание обусловлено эмбрионным состоянием клеточных линий. Изофукостерин в заметных количествах найден только в эмбрионных линиях. Во фракции эфиров стеринов неэмбрионных линий обнаружено большее разнообразие компонентов по сравнению с эмбрионными линиями. Во всех клеточных линиях среди идентифицированных стериновых эфиров преобладали соединения без двойных связей, несущие в качестве структурного фрагмента стерановое ядро (кор) – циклопентанопергидрофенантрен: их содержание варьировало от 52 до 71% от суммы эфиров стеринов. Обнаруженные различия в составе стеринов и эфиров стеринов у клеточных линий *L. sibirica* с разным эмбрионным потенциалом свидетельствуют о значительных перестройках в метаболизме стеринов в ходе эмбриогенеза, которые, могут быть связаны с их участием в этом процессе на стадии формирования зародышей.

**Ключевые слова:** *Larix sibirica*, клеточные линии, соматический эмбриогенез, стерины, эфиры стеринов

**DOI:** 10.31857/S0015330322600516, **EDN:** GKWEZO

### ВВЕДЕНИЕ

Соматический эмбриогенез является одним из перспективных направлений в биотехнологии микрорепродукции растений в культуре *in vitro*. При таком способе размножения становится возможным массовое воспроизводство растительного материала идентичного материнскому генотипу [1]. Из-за недостатка сведений о молекулярных механизмах индукции соматического эмбриогенеза, особенно для древесных видов, в частности, хвойных, получение и развитие соматических за-

родышей до настоящего времени остается трудноосуществимой задачей [2]. Изучение последовательности событий индукции соматического эмбриогенеза и этапов его последующего развития имеет достаточно длительную историю [3], однако роль липидных компонентов в этих процессах в культуре *in vitro* хвойных видов все еще остается малоизученной. На сегодняшний день этой проблеме посвящены единичные исследования [4–7]. Например, установлено, что качественный и количественный составы некоторых липидов у эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* существенно различаются. Так, для эмбрионных линий характерно повышенное содержание олеиновой кислоты [5], глицеридов [6], фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилинозитов [7], по сравнению с неэмбрионными. Однако полной

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330322600516 для авторизованных пользователей.

**Сокращения:** БС – brassinosteroidы; ГХ-МС – метод газовой хромато-масс-спектрометрии; ЭСМ – эмбрионально-суспензорная масса.

ясности в вопросах липидного обмена в культуре растительных тканей *in vitro*, в том числе, сведений об участии в процессах эмбриогенеза отдельных групп липидов, в частности, эфиров стерина, а также свободных стерина пока нет.

В настоящее время известно более 200 видов растительных стерина [8]. В растениях они присутствуют как в свободном состоянии (свободные стерин), так и в виде производных, представляющих собой эфиры жирных кислот или гликозиды (стерилгликозиды и ацилстерилгликозиды) [8]. Стерин и их производные задействованы во многих клеточных процессах. Например, стерин играют важную роль в регуляции текучести мембраны и ее проницаемости [9]. Для плазматической мембраны характерны высокая вариабельность стеринового состава, а также различия в соотношении стерин/мембранные липиды, в зависимости от вида растения, стадии его развития, органа и ткани [10]. Функции отдельных стерина в составе мембран также различны. Известно, что  $\beta$ -ситостерин и кампестерин являются наиболее эффективными соединениями для ограничения подвижности фосфолипидных жирных ацильных цепей, по сравнению со стигмастерином. Кроме того,  $\beta$ -ситостерин и кампестерин, в отличие от стигмастерина, снижают проницаемость мембран [8, 11]. Стигмастерин, являющийся “стрессовым” стерином, как предполагается, влияет на распределение других мембранных липидов, метаболические процессы в мембранах, а также на сигнальные пути, изменяющие экспрессию “стрессовых” генов [12]. Поддержание определенного состава стерина в клеточных мембранах необходимо для оптимальной активности ферментов, транспорта ионов и метаболитов через каналы, белок-белковых и белок-липидных взаимодействий, а также трансдукции сигналов [8, 13]. Важно отметить, что стерин являются предшественниками брассиностероидов (БС) – гормонов, регулирующих рост и развитие растений [9, 14]. Известно, что БС принимают активное участие в элонгации клеток растений и морфогенезе органов, клеточном делении, модуляции гормональных ответов, а также в ответной реакции клеток на стрессовые воздействия [15, 16]. Кроме того, БС регулируют множество физиологических реакций, необходимых как для вегетативной, так и для репродуктивной стадий развития растений [15, 17, 18].

Растительные стерин играют важную роль в ходе эмбриональной и постэмбриональной стадий развития, а также во время цветения [19, 20]. Это касается как целых растений, так и культуры растительных тканей. В ряде работ были обнаружены изменения состава и содержания стерина в процессе соматического эмбриогенеза растений *in vitro*. Так, установлено, что содержание стерина в культуре льна посевного (*Linum usitatissimum* L.)

различалось в зависимости от степени дифференциации клеток [21]. Индукция соматического эмбриогенеза и органогенеза побегов льна была связана с увеличением общего количества стерина в компетентных к эмбриогенезу каллусах и повышенным соотношением стигмастерина к  $\beta$ -ситостерину в эмбрионах и побегах. Напротив, в неорганогенных каллусах величина соотношения стигмастерин/ $\beta$ -ситостерин снижалась во время фазы экспоненциального роста из-за значительного увеличения содержания  $\beta$ -ситостерина. В работе [22] показано, что результатом дифференциации клеток *Brassica napus* L. в культуре *in vitro* было изменение состава свободных стерина в регенерирующих каллусах, при этом содержание стигмастерина увеличивалось, а кампестерина уменьшалось.

Таким образом, анализ литературы свидетельствует о важной роли стерина в жизнедеятельности растений и их адаптации к условиям внешней среды. Стерин являются структурными компонентами клеточных мембран, принимают активное участие в регуляции процессов онтогенеза и стрессоустойчивости растений. Многообразие стеринового состава позволяет растениям на клеточном уровне адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Очевидно, что в значительной мере аналогичные клеточные механизмы реализуются и в случае адаптации растительных клеток *in vitro*. При этом необходимо принимать во внимание, что стресс может быть одним из индукторов процесса эмбриогенеза. Следовательно, наряду с фитогормонами, фенольными и другими соединениями, стерин играют важную роль в процессах роста и развития растительных клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. Поэтому изучение особенностей состава стерина и их эфиров, как возможных маркеров процесса развития в клеточных линиях с разным эмбриогенным потенциалом *in vitro*, позволит прояснить роль этих соединений в процессе эмбриогенеза, что важно как для фундаментальных, так и для прикладных исследований.

Цель работы – провести сравнительный анализ качественного и количественного составов свободных стерина и их эфиров в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях листовенницы сибирской на ранней стадии развития.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** В качестве растительного материала использовали эмбриогенные и неэмбриогенные клеточные линии листовенницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), полученные И.Н. Третьяковой с соавт. [1, 2] в Институте леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск). Клеточные линии *L. sibirica* поддерживали в течение 6 лет на агаризованной питательной среде АИ, разработанной И.Н. Третьяковой [2]. В качестве

регуляторов роста использовали 2,4-Д (2 мг/л) и БАП (0.5 мг/л). Для анализа качественного и количественного составов стеринов каллусов листовницы сибирской использовали эмбриогенные долгоживущие клеточные линии Кл2, Кл4, Кл6, Кл10 на стадии пролиферации эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) и неэмбриогенные клеточные линии Кл23 и Кл31. Клеточные линии имели видимые внешние различия: эмбриогенные – кремового цвета, рыхлые, со сформированными незрелыми соматическими зародышами; неэмбриогенные – кремового цвета, плотные, глобулярные, без зародышей. Каждая эмбриогенная клеточная линия представляла собой ЭСМ, состоящую из глобулярных зародышей (эмбрионов) и суспензоров. В ЭСМ образуются полиэмбриональные комплексы, состоящие из нескольких эмбрионов, других клеток в ней не наблюдается [2]. Для эмбриогенных клеточных линий число зародышей составляло от 2 (Кл2, Кл6) до 11 (Кл10) тыс. шт./г сырой массы ЭСМ [1, 2]. Эмбриогенные клеточные линии *L. sibirica* со сформированными незрелыми соматическими зародышами в дальнейшем могут формировать растения-регенеранты, при этом линия Кл4 была наиболее перспективной в этом отношении, в то время как неэмбриогенные клеточные линии не формируют соматические зародыши и, соответственно, не обладают способностью к регенерации [1, 2].

Оводненность тканей клеточных линий составляла 95–97%. Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 28 дней. Материал для исследования во всех случаях брали на 28 сутки выращивания каллусных культур (фаза роста – стадии замедления роста).

**Выделение липидной фракции.** Для выделения липидной фракции навеску растительного материала (0.5 г) фиксировали в жидком азоте и растирали в ступке до получения гомогенной массы. Затем добавляли 10 мл смеси хлороформ : метанол (2 : 1 v/v), используя хлороформ, стабилизированный 0.005% массовой долей амилена, а также ионол в качестве антиоксиданта (из расчета 1.25 мг на 100 мл указанной смеси растворителей). Полученную суспензию тщательно перемешивали и оставляли на 30 мин для извлечения липидов растворителем. Полученный раствор отделяли от осадка фильтрованием. Ступку и фильтр с остатками растительного материала трижды промывали используемой смесью растворителей и объединяли с основным объемом раствора. В делительную воронку с объединенным раствором добавляли воду и оставляли до расслаивания водной и органической фаз. После органическую (нижнюю, хлороформную) фазу, содержащую сумму липидных компонентов, отделяли от водной фазы. Хлороформ из полученного липидного экстракта удаляли при пониженном давлении с помощью ротационного испарителя RVO-64 (Микротехна, Чехия).

**Выделение стериновых компонентов.** Обнаружение и выделение стериновых компонентов (свободных стеринов и стериновых эфиров) осуществляли с помощью метода ТСХ. Для этого полученную фракцию, содержащую сумму липидов, повторно растворяли в 200 мкл хлороформа и наносили тонкой полосой на высокоэффективную пластинку Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) (сорбент силикагель СТХ-1ВЭ, зернение 8–12 мкм, толщина слоя 80–100 мкм). Операцию нанесения пробы повторяли дважды. Пластину помещали в хроматографическую камеру и осуществляли хроматографирование элюентом следующего состава: гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (80 : 20 : 1 v/v/v). По окончании хроматографирования (когда элюент доходил до края пластины), пластину вынимали из камеры и высушивали. Для обнаружения стериновых компонентов край пластины (0.5 см) обрабатывали 10% раствором серной кислоты в этаноле, а затем нагревали на электроплитке до 110°C. Зоны обнаружения стериновых компонентов проявлялись на пластинке розово-голубыми пятнами. Рассчитанные значения  $R_f$  для свободных стеринов ( $R_f = 0.19$ ) и стериновых эфиров ( $R_f = 0.87–0.92$ ) совпадали со значениями  $R_f$  для стандартных образцов (холестерин, стигмастерин, кампестерин (Sigma, США)),  $\beta$ -ситостерин (European pharmacopoeia reference standard, Франция) и табличными значениями. После хроматографирования с высушенной необработанной пластины шпателем удаляли сорбент в зонах обнаружения стериновых компонентов. Сорбент с хроматографической пластины количественно переносили в центрифужные пробирки (10 мл) и добавляли в них по 1.5 мл хлороформа. Извлечение стериновых компонентов с адсорбента в среду хлороформа осуществляли с помощью облужения ультразвуком (частота 35 кГц, мощность 80 Вт, продолжительность 15 мин), используя ультразвуковую ванну (Bandelin Sonorex, Германия). Суспензию адсорбента в хлороформе центрифугировали (5 мин) при 3000 об/мин. После центрифугирования надосадочный раствор переносили в стеклянные флаконы (2 мл). Из полученных растворов упаривали (досуша) хлороформ в инертной атмосфере (в токе азота) во избежание окисления выделяемых субстанций. Для полноты выделения стериновых компонентов к сорбенту, оставшемуся в пробирке, добавляли 1.5 мл этилацетата и повторяли экстракцию с использованием ультразвукового воздействия дважды. К полученным свободным стеринам и их эфирам в качестве внутреннего стандарта добавляли эргостерин (20 мкг) (Sigma, США) – компонент, не встречающийся в объектах исследования. Для получения необходимых для анализа методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) летучих производных свободные стерины и эфиры стеринов подвергали модификации – силилированию путем обработки N,O-бис-(триметилси-



лил)трифторацетамидом с триметилхлорсиланом (200 мкл) (Fluka, США). Силилирование проводили в сушильном шкафу (Binder, Германия) в течение 30 мин при 70°C. Полученные триметилсил-лил-производные анализировали с помощью метода ГХ-МС.

**ГХ-МС анализ.** Анализ проводили с помощью хромато-масс-спектрометра Agilent G7000B Triple Quad (Agilent Technologies Inc., США), состоящего из газового хроматографа 7890A (колонка HP-5MS, 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм со стационарной фазой метилполисилаксан) и масс-селективного детектора Agilent 7000 (QQQ) с трехквadrупольным масс-анализатором (в режиме квадруполь). Температурная программа хроматографирования: при 70°C (1 мин), изотерма; далее программируемый нагрев до 280°C со скоростью 5°C/мин; при 280°C (5 мин), изотерма; далее программируемый нагрев до 300°C со скоростью 20°C/мин; при 300°C (3 мин), изотерма. Инжектор с делением потока 5 : 1. Температура инжектора 250°C, температура детектора 150°C, температура интерфейса 280°C. Газ-носитель – гелий, скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл. Хроматограмма образцов – по полному ионному току (SCAN). Условия масс-спектрометрического детектирования: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров положительных ионов в диапазоне ( $m/z$ ) от 50 до 600 а.е.м. со скоростью 1.9 скан/сек. Программное обеспечение – MassHunter GC/MS Acquisition B.05.00.412 и Mass Hunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.03.01 Build 3.1.346.14 Service Pack 3 (Agilent Technologies Inc., США).

**Детектирование и количественный анализ.** Идентификация компонентного состава (качественный анализ) проведена в соответствии с базой данных полных масс-спектров (NIST-08 и Wiley-7), с учетом фрагментных диагностических пиков, присутствующих в масс-спектрах и характеризующих структурные особенности исследуемых соединений, а также в соответствии со значениями хроматографического времени удерживания (Retention Time, RT) стандартных образцов. В качестве стандартных образцов использовали холестерин, стигмастерин, кампестерин (Sigma, США) и  $\beta$ -ситостерин (European pharmacopoeia reference standard, Франция). Относительное содержание (%) компонентов смеси (количественный анализ) вычислено из соотношения площадей хроматографических пиков (методом простого нормирования). Количественный анализ исследуемых компонентов проводили методом внешней калибровки с учетом отклика внутреннего стандарта по формуле:

$$C_{\text{СТЕРИНА}} = \frac{C_{\text{СТ}} S_{\text{СТЕРИНА}}}{a S_{\text{СТ}} + b S_{\text{СТЕРИНА}}},$$

где  $C_{\text{СТЕРИНА}}$  – концентрация искомого стерина,  $C_{\text{СТ}}$  – концентрация стандарта,  $S_{\text{СТЕРИНА}}$  – площадь искомого стерина,  $S_{\text{СТ}}$  – площадь стандарта,  $a$  и  $b$  – поправочные коэффициенты.

**Статистическая обработка.** В таблицах представлены средние данные из четырех-шести биологических повторностей и их стандартные отклонения. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа в среде Microsoft Office Excel 2010. Нормальность распределения полученных значений определяли по критерию Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий сравниваемых средних значений оценивали с помощью  $t$ -критерия ( $P < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты ГХ-МС анализа компонентного состава свободных стеринов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской приведены в табл. 1 и 2, а эфиров стеринов – в табл. 3, 4 и 5. Подробный компонентный состав фракций стеринов и их эфиров представлен в табл. 1 и 2 (Дополнительные материалы). Следует отметить, что свободные стеринные клеточных линий отличались большим разнообразием компонентов и насчитывали от 11 (Кл2) до 21 (Кл4, Кл10) различных соединений, по сравнению с эфирами стеринов, которых было обнаружено 10 соединений у эмбрионных клеточных линий и 16 – у неэмбрионных.

Как известно, свободные стеринны по химической структуре относятся к изопреноидам с циклопентанопергидрофенантеном в качестве остова [8]. Методом ГХ-МС в клеточных линиях *L. sibirica* среди свободных стеринов были обнаружены соединения как без двойных связей в структуре циклопентанопергидрофенантрена, в их числе циклоартенол, так и с двойными связями: в положении  $\Delta 8$ ,  $\Delta 4$ ,  $\Delta 12$  и две большие группы свободных стеринов с двойными связями в положении  $\Delta 7$  и  $\Delta 5$  (табл. 1). Среди  $\Delta 7$ -стеринов обнаружен холестерин-7-ан-3 $\beta$ -ол, являющийся предшественником холестерина и авенастерин – предшественник 24-этилстеринов. Основной вклад в общее количество свободных стеринов внесли  $\Delta 5$ -стеринны (холест-5-ен-3-он, холест-5-ен-24-он, прегн-5-ен-20-он,  $\gamma$ -ситостерин, изофукостерин, холестерин, кампестерин, стигмастерин,  $\beta$ -ситостерин), их относительное содержание варьировало от 90.7% (Кл31) до 98.6% (Кл6) от суммы свободных стеринов (табл. 1; Дополнительные материалы, табл. 1). Хроматографическое время удерживания (RT) и характеристические ионы ( $m/z$ ), наблюдаемые в масс-спектрах идентифицированных стеринных компонентов, представлены в табл. 6.

**Таблица 1.** Содержание компонентов фракции свободных стеридов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской (% по весу)

| Соединения                 | Кл2 (э)    | Кл4 (э)    | Кл6 (э)    | Кл10 (э)   | Кл23 (нэ)   | Кл31 (нэ)  |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| Стериды                    |            |            |            |            |             |            |
| Без двойной связи          | 1.9 ± 0.1  | 2.8 ± 0.2  | 0.3 ± 0.0  | 6.0 ± 0.5  | 3.3 ± 0.3   | 6.0 ± 0.5  |
| С разными двойными связями | 1.8 ± 0.2  | 0.2 ± 0.0  | 0.1 ± 0.0  | 0.1 ± 0.0  | 0.03 ± 0.00 | 1.2 ± 0.1  |
| ΣΔ7-стеридов               | 3.1 ± 0.4  | 1.6 ± 0.2  | 1.0 ± 0.1  | 1.4 ± 0.1  | 2.3 ± 0.3   | 2.1 ± 0.1  |
| ΣΔ5-стеридов               | 93.2 ± 1.0 | 95.3 ± 1.0 | 98.6 ± 1.1 | 92.5 ± 0.4 | 94.4 ± 0.9  | 90.7 ± 1.1 |
| Δ5-стериды                 |            |            |            |            |             |            |
| Изофукостерин              | 12.9 ± 1.2 | 15.3 ± 0.1 | 18.0 ± 1.3 | 17.7 ± 0.3 | —           | 2.6 ± 0.1  |
| Холестерин                 | 0.2 ± 0.0  | 0.6 ± 0.0  | 1.8 ± 0.2  | 0.4 ± 0.0  | 0.4 ± 0.0   | 0.2 ± 0.0  |
| Кампестерин                | 9.2 ± 0.9  | 15.5 ± 0.7 | 19.8 ± 0.6 | 12.5 ± 0.3 | 10.2 ± 1.2  | 4.6 ± 0.6  |
| Стигмастерин               | 1.0 ± 0.1  | 6.3 ± 0.3  | 4.1 ± 0.2  | 23.2 ± 1.4 | 3.9 ± 0.4   | 2.9 ± 0.2  |
| β-ситостерин               | 65.6 ± 4.9 | 54.3 ± 0.9 | 54.2 ± 2.0 | 38.4 ± 1.1 | 75.9 ± 1.2  | 75.6 ± 2.0 |

Примечание. (э) – эмбрионные клеточные линии; (нэ) – неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при  $P < 0.05$ .

**Таблица 2.** Абсолютное содержание наиболее распространенных Δ5-стеридов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской во фракции свободных стеридов

| Стериды,<br>мкг/г сухого веса | Кл2 (э)       | Кл4 (э)      | Кл6 (э)      | Кл10 (э)    | Кл23 (нэ)    | Кл31 (нэ)     |
|-------------------------------|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------|
| Холестерин                    | 4.2 ± 0.3     | 6.7 ± 2.8    | 17.6 ± 1.5   | 4.4 ± 1.5   | 4.4 ± 0.7    | 4.2 ± 0.1     |
| Кампестерин                   | 191.8 ± 8.1   | 166.2 ± 7.7  | 199.2 ± 12.0 | 133.8 ± 1.3 | 104.3 ± 2.9  | 102.4 ± 0.9   |
| Стигмастерин                  | 21.8 ± 1.3    | 67.2 ± 8.0   | 41.7 ± 4.9   | 248.2 ± 3.8 | 40.0 ± 0.1   | 63.9 ± 1.3    |
| β-ситостерин                  | 1370.1 ± 49.3 | 582.5 ± 53.5 | 544.7 ± 32.3 | 410.0 ± 7.1 | 776.5 ± 96.5 | 1684.8 ± 23.7 |
| Стигмастерин/Ситостерин       | 0.02 ± 0.00   | 0.12 ± 0.01  | 0.08 ± 0.01  | 0.61 ± 0.02 | 0.05 ± 0.01  | 0.04 ± 0.00   |
| Ситостерин/Кампестерин        | 7.14 ± 0.05   | 3.50 ± 0.17  | 2.73 ± 0.10  | 3.06 ± 0.08 | 7.44 ± 1.17  | 16.45 ± 0.19  |

Примечание. (э) – эмбрионные клеточные линии; (нэ) – неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при  $P < 0.05$ .

**Таблица 3.** Содержание различных компонентов во фракции эфиров стеридов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской (% по весу)

| Соединения                 | Кл2 (э)    | Кл4 (э)    | Кл6 (э)    | Кл10 (э)   | Кл23 (нэ)  | Кл31 (нэ)  |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Эфиры стеридов             |            |            |            |            |            |            |
| Без двойной связи          | 54.4 ± 0.6 | 61.0 ± 3.9 | 52.8 ± 3.1 | 71.1 ± 3.3 | 61.9 ± 2.3 | 55.7 ± 0.1 |
| С разными двойными связями | 15.5 ± 0.1 | 4.6 ± 0.5  | 2.6 ± 0.3  | 3.1 ± 0.3  | 4.0 ± 0.3  | 4.0 ± 0.0  |
| Δ5-стериды                 | 17.6 ± 0.4 | 8.6 ± 0.6  | 10.4 ± 0.9 | 10.7 ± 1.0 | 15.6 ± 1.8 | 7.8 ± 0.2  |
| Δ5-стериды                 |            |            |            |            |            |            |
| Холестерин                 | 3.1 ± 0.2  | 2.2 ± 0.3  | 3.6 ± 0.4  | 3.1 ± 0.4  | 1.9 ± 0.2  | 1.4 ± 0.1  |
| Кампестерин                | 1.6 ± 0.2  | 2.1 ± 0.2  | 2.3 ± 0.3  | 3.1 ± 0.4  | 1.4 ± 0.1  | 0.5 ± 0.0  |
| Стигмастерин               | 4.7 ± 0.5  | 2.4 ± 0.3  | 1.8 ± 0.2  | 2.2 ± 0.3  | 1.0 ± 0.1  | 1.5 ± 0.1  |
| β-ситостерин               | 8.3 ± 0.2  | 1.9 ± 0.2  | 2.8 ± 0.3  | 2.4 ± 0.2  | 2.1 ± 0.3  | 1.7 ± 0.2  |

Примечание. (э) – эмбрионные клеточные линии; (нэ) – неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при  $P < 0.05$ .

**Таблица 4.** Абсолютное содержание наиболее распространенных эфиров  $\Delta^5$ -стеринов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской, во фракции свободных стеринов

| Эфиры стеринов, мкг/г сухого веса | Кл2 (э)   | Кл4 (э)   | Кл6 (э)   | Кл10 (э)  | Кл23 (нэ) | Кл31 (нэ) |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Холестерин                        | 1.2 ± 0.1 | 1.3 ± 0.1 | 2.8 ± 0.1 | 1.4 ± 0.3 | 5.8 ± 0.0 | 3.2 ± 0.4 |
| Кампестерин                       | 0.6 ± 0.0 | 1.2 ± 0.2 | 1.8 ± 0.4 | 1.4 ± 0.4 | 4.3 ± 0.7 | 1.1 ± 0.1 |
| Стигмастерин                      | 1.8 ± 0.2 | 1.4 ± 0.1 | 1.4 ± 0.2 | 1.0 ± 0.1 | 3.1 ± 0.8 | 3.3 ± 0.1 |
| $\beta$ -ситостерин               | 3.2 ± 0.1 | 1.1 ± 0.4 | 2.2 ± 0.2 | 1.1 ± 0.1 | 6.5 ± 0.5 | 3.8 ± 0.4 |

Примечание. (э) – эмбрионные клеточные линии; (нэ) – неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при  $P < 0.05$ .

**Таблица 5.** Содержание соединений не циклической природы во фракции эфиров стеринов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской (% по весу)

| Соединения                                     | Кл2 (э)    | Кл4 (э)    | Кл6 (э)    | Кл10 (э)   | Кл23 (нэ)  | Кл31 (нэ)  |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Сквален  | 12.5 ± 0.1 | 25.8 ± 2.8 | 34.2 ± 3.3 | 15.1 ± 1.6 | 2.3 ± 0.3  | 2.9 ± 0.0  |
| 9,10-секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3,25-триол | –          | –          | –          | –          | 16.2 ± 2.3 | 29.6 ± 0.1 |

Примечание. (э) – эмбрионные клеточные линии; (нэ) – неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при  $P < 0.05$ .

**Таблица 6.** Хроматографическое время удерживания (RT, мин) и характеристические ионы ( $m/z$ ), наблюдаемые в масс-спектрах идентифицированных стериновых компонентов

| Соединения                                     | RT, мин | $m/z$              |
|--|---------|--------------------|
| Циклоартенол                                   | 22.757  | 458, 75, 255, 458  |
| Авенастерин                                    | 22.914  | 484, 343, 386, 344 |
| Изофукостерин                                  | 22.103  | 484, 386, 296, 257 |
| Холестерин                                     | 19.514  | 458, 329, 129, 368 |
| Кампестерин                                    | 20.734  | 472, 129, 343, 382 |
| Стигмастерин                                   | 21.057  | 484, 83, 55, 129   |
| $\beta$ -ситостерин                            | 21.938  | 486, 129, 357, 396 |
| Этилизо-аллохолат                              | 10.549  | 436, 55, 57, 81    |
| 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси           | 18.755  | 502, 57, 69, 95    |
| Сквален  | 16.688  | 410, 69, 81, 95    |
| 9,10-секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3,25-триол | 7.278   | 502, 55, 57, 71    |

Наибольший вклад в суммарное содержание свободных стеринов эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* внесли (% от суммы свободных стеринов):  $\beta$ -ситостерин (38.4–65.6), кампестерин (9.2–19.8), изофукостерин (12.9–18.0) и стигмастерин (1.0–23.2) (табл. 2). Наибольший вклад в суммарное содержание свободных стеринов (% от суммы свободных стеринов) неэмбрионных линий внесли  $\beta$ -ситостерин (75.6–75.9), кампестерин (4.6–10.2) и стигмастерин (2.9–3.9). Изофукостерин в неэмбрионных линиях, в отличие от эмбрионных, либо не был обнаружен (Кл23), либо обнаружен в незначительных количествах (2.6% от суммы свободных стеринов для Кл31).

Доминирующим стеринном во всех клеточных линиях *L. sibirica* был  $\beta$ -ситостерин – его содержание варьировало от 410.0 (Кл10) до 1684.8 (Кл31) мкг/г сухого веса образца (табл. 2). Содержание  $\beta$ -ситостерина было достоверно выше в неэмбрионных клеточных линиях, по сравнению с эмбрионными. Абсолютное содержание кампестерина было достоверно более высоким в эмбрионных клеточных линиях – от 133.8 (Кл10) до 199.2 (Кл6) мкг/г сухого веса, чем в неэмбрионных, где этот показатель составлял 102.4 (Кл31) – 104.3 (Кл23) мкг/г сухого веса (табл. 2). Значимых отличий в распределении стигмастерина и холестерина между эмбрионными и неэмбрио-

генными клеточными линиями выявлено не было (табл. 2). Абсолютное содержание стигмастерина варьировало в пределах от 21.8 (Кл2) до 248.2 (Кл10) мкг/г сухого веса. Абсолютное содержание холестерина у всех линий было значительно ниже, чем стигмастерина и составляло от 4.2 (Кл31) до 17.6 (Кл6) мкг/г сухого веса. Следует отметить, что в эмбрионных клеточных линиях листовенницы сибирской обнаружено довольно высокое относительное содержание изофукостерина (12.9% (Кл2) и 18.0% (Кл6) от суммы свободных стеринов), в то время как в неэмбрионных клеточных линиях этот стерин был обнаружен только в линии Кл31 в минорном количестве.

Во всех клеточных линиях *L. sibirica* во фракции эфиров стеринов в небольшом количестве были обнаружены эфиры холестерина, кампестерина, стигмастерина,  $\beta$ -ситостерина (табл. 3, 4). Наибольший вклад в суммарное содержание эфиров стеринов во всех клеточных линиях вносили соединения без двойной связи в структуре циклопентанопергидрофенантрена: от 52.8% (Кл6) до 71.1% (Кл10) от суммы эфиров стеринов (табл. 3). Кроме того, этот тип соединений включал в себя наибольшее разнообразие эфиров – 7 соединений (Дополнительные материалы, табл. 2). Среди эфиров стеринов всех клеточных линий, в отличие от свободных стеринов, не были обнаружены  $\Delta^7$ -стерины. Во фракции, содержащей эфиры стеринов, был идентифицирован сквален – углеводород тритерпенового ряда (табл. 5). Относительное содержание этого компонента (% от суммы эфиров стеринов) в эмбрионных линиях было значительно выше (12.5 (Кл2) – 34.2 (Кл6)), чем в неэмбрионных (2.3% (Кл23) – 2.9% (Кл31)).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что холестерин оказывает значительное влияние на мембранную проницаемость, в меньшей степени такое влияние оказывают кампестерин,  $\beta$ -ситостерин и стигмастерин [8]. У растений содержание холестерина, как правило, достаточно низкое. Так, у арабидопсиса содержание холестерина составляло 3.8% от суммы свободных стеринов [23], а в надземных частях хвоща пестрого (*Equisetum variegatum* Shleich. ex Web.) содержание холестерина снижалось к осенней вегетации с 1.2 до 0.6% от суммы свободных стеринов (с 4.9 до 2.7 мкг/г сухого веса) по сравнению с летней [24]. В растительных тканях *in vitro* холестерин может отсутствовать. Например, холестерин не был обнаружен в каллусных культурах *Euphorbia tirucalli* L. [25] и *Linum usitatissimum* L. [21], но содержался в малых количествах (1.2%) в суспензионной культуре *Nicotiana tabacum* L. [26]. В наших экспериментах абсолютное содержание холестерина во всех клеточных линиях *L. sibirica* было значительно ниже, чем стигмастерина и ва-

рьировало от 4.2 (Кл31) до 17.6 (Кл6) мкг/г сухого веса или от 0.2% (Кл2, Кл31) до 1.8% (Кл6) от суммы свободных стеринов. При этом анализ полученных результатов не выявил различий в содержании холестерина между эмбрионными и неэмбрионными линиями.

Как уже говорилось выше, доминирующим стеринном во всех клеточных линиях *L. sibirica* был  $\beta$ -ситостерин – его содержание варьировало от 410.0 (Кл10) до 1684.8 (Кл31) мкг/г сухого веса (табл. 2). Следует отметить, что содержание этого стерина было достоверно выше в неэмбрионных клеточных линиях, по сравнению с эмбрионными (табл. 2). Однако было и исключение: в эмбрионной линии Кл2 содержание  $\beta$ -ситостерина было более высоким (1370.1 мкг/г сухого веса), чем в других эмбрионных линиях и, таким образом, сравнимо с таковым у неэмбрионных линий. Известно, что  $\beta$ -ситостерин является важным участником процесса элонгации клеток [27], а также участвует в процессах их пролиферации [28] и дифференциации [29]. В растениях *in vivo*  $\beta$ -ситостерин также обычно является преобладающим стеринном, однако, его содержание может отличаться в тканях отдельных органов. Например, в цветках и плодах *Olea europaea* L. cv. Pical, содержание этого стерина составляло 97 и 92% от суммы свободных стеринов, соответственно [30]. У *N. tabacum* L. var. Xanthi содержание  $\beta$ -ситостерина в корнях составляло 31%, а в листьях 18% от суммы свободных стеринов [31]. Для *Triticum aestivum* L. (сорт Казанская Юбилейная), также отмечено более высокое содержание этого стерина в корнях, чем в листьях – 60.5 и 55.6% от суммы свободных стеринов, соответственно [32]. Что касается растений *in vitro*, то  $\beta$ -ситостерин не всегда является преобладающим. Например, в суспензионной культуре сельдерея (*Apium graveolens* L.) отмечено более низкое относительное содержание этого стерина – 28.3% от суммы свободных стеринов, тогда как доминирующим стеринном был стигмастерин (44.2% от суммы свободных стеринов) [33]. Известно, что содержание стеринов в каллусной культуре растений зависит от исходного материала (типа экспланта) [34]. Например, в каллусах *Crataeva tapia* L., полученных из листьев, содержание  $\beta$ -ситостерина варьировало от 360 до 1230 мкг/г сухого веса, тогда как в каллусах, полученных из тканей стебля, оно было более высоким и составляло 420–3410 мкг/г сухого веса [34]. Показано также, что в эмбрионных и неэмбрионных каллусах льна (*L. usitatissimum* L.) абсолютное содержание  $\beta$ -ситостерина было около 800 и 700 мкг/г сухого веса (53.3 и 50.0% от суммы свободных стеринов), соответственно [21]. Этими же авторами установлена связь между накоплением  $\beta$ -ситостерина и ростом биомассы неэмбрионных каллусов. По-видимому, уровень  $\beta$ -ситостерина, необходимый для нормального

развития растения *in vivo* и *in vitro* является видоспецифическим признаком. При этом, как известно, важное физиологическое значение имеет баланс содержаний стигмастерина и  $\beta$ -ситостерина [8].

Стигмастерин считается “стрессовым” стеринном, поскольку его содержание в тканях возрастает при реакции растений на стрессирующие воздействия различной природы [8]. У высших растений содержание стигмастерина обычно ниже, чем  $\beta$ -ситостерина. Например, у арабидопсиса содержание стигмастерина составляло всего 4.2% от суммы свободных стериннов [23]. В работе [24] авторами показано, что в надземных частях хвоща пестрого стигмастерин обнаружен только в образцах осенней вегетации (4.3 мкг/г сухого веса) при относительно низкой температуре. Имеющиеся в литературе данные показывают, что для каллусов, полученных от разных видов растений, содержание этого стерина может существенно различаться. Например, в суспензионной культуре табака (*N. tabacum* L.) содержание стигмастерина составляло 7.1% [26], а в каллусах молочая (*E. tirucalli* L.) – от 5.9 до 34.3% от суммы свободных стериннов [25]. В нашем исследовании не было выявлено значимых отличий в распределении стигмастерина (и холестерина) между эмбрионными и неэмбрионными клеточными линиями листовницы сибирской (табл. 2). Относительное и абсолютное содержание стигмастерина варьировало в пределах от 21.8 (Кл2) до 248.2 (Кл10) мкг/г сухого веса или от 1.0% (Кл2) до 23.2% (Кл10) от суммы свободных стериннов, за одним исключением. Среди эмбрионных линий, Кл10 отличалась значительно более высоким абсолютным и относительным содержанием этого стерина (248.2 мкг/г сухого веса и 23.2% соответственно), чем все остальные линии. Следует отметить, что на ранней стадии культивирования (1 год) Кл10 формировала самое высокое число зародышей, однако при более длительном культивировании эта линия характеризовалась низким относительным количеством нормальных соматических зародышей и более низким процентом их прорастания относительно других эмбрионных линий [35]. Учитывая, что низкое соотношение стигмастерин/ $\beta$ -ситостерин характерно для линий с более высоким потенциалом выхода нормальных соматических зародышей и процентом их прорастания, можно предположить, что соотношение этих двух стериннов важно для регуляции нормального развития эмбрионных тканей в культуре листовницы сибирской. Известно, что высокие значения соотношения стигмастерин/ $\beta$ -ситостерин характерны для стрессового состояния растений [8]. Можно предположить, что увеличение на порядок этого параметра для Кл10, относительно других эмбрионных клеточных линий, связано со стрессовым состоянием тканей

этой линии, обусловленным особенностями ее развития.

В растениях предшественником  $\beta$ -ситостерина в биосинтезе стериннов является изофукостерин [13, 36]. Его содержание может быть достаточно высоким, наряду с другими распространенными стеринами, такими как  $\beta$ -ситостерин, кампестерин и стигмастерин [8]. Например, в каллусах *E. tirucalli* содержание изофукостерина составляло от 20.7 до 90.3% от суммы свободных стериннов [25]. В наших экспериментах относительное содержание изофукостерина в эмбрионных клеточных линиях листовницы сибирской варьировало от 12.9% (Кл2) до 18.0% (Кл6) от суммы свободных стериннов. В неэмбрионных клеточных линиях изофукостерин был обнаружен только в линии Кл31, где его содержание было в 5-7 раз ниже, чем в эмбрионных линиях. Можно предположить, что в эмбрионных клеточных линиях конвертация изофукостерина в  $\beta$ -ситостерин (посредством работы SSR1 – Sterol Side-chain Reductase – редуктазы боковой цепи) менее интенсивна, чем у неэмбрионных. В биосинтезе стериннов SSR1 участвует не только в образовании  $\beta$ -ситостерина из изофукостерина, но также в образовании кампестерина из 24-метилхлестерина [14, 36]. Особенности работы этого фермента в эмбрионных и неэмбрионных линиях листовницы сибирской могло бы объясняться не только более высоким содержанием  $\beta$ -ситостерина в неэмбрионных каллусах, но и более высоким содержанием кампестерина в эмбрионных линиях. В наших экспериментах относительное содержание кампестерина составляло около 19% от суммы свободных стериннов в эмбрионных линиях и 4.6% (Кл31) и 10.2% (Кл23) от суммы свободных стериннов в неэмбрионных (табл. 2). Что касается абсолютного содержания кампестерина, то в эмбрионных линиях оно было значительно (в линии Кл6 в два раза) выше (от 133.8 (Кл10) до 199.2 (Кл6) мкг/г сухого веса), чем в неэмбрионных, где этот показатель составлял 102.4 (Кл31) – 104.3 (Кл23) мкг/г сухого веса (табл. 2). Следует отметить, что линия Кл10, имеющая низкий выход нормальных зародышей, имела наиболее низкое содержание кампестерина среди эмбрионных линий.

Известно, что кампестерин является основным предшественником БС, которые у многих растений играют важную роль в их росте и развитии. БС вызывают широкий спектр морфологических и физиологических реакций и влияют на устойчивость растений к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Предполагается, что дефекты роста тканей могут быть связаны с отсутствием достаточного количества кампестерина в качестве предшественника БС [13]. Кампестерин стимулирует рост и развитие растительных тканей в условиях *in vivo* и в культуре *in vitro* и

участвует в регуляции морфогенетических процессов [9, 14]. Поэтому можно предположить, что установленное в наших экспериментах высокое абсолютное содержание кампестерина в эмбрионных линиях листовницы сибирской, значительно превышающее таковое у неэмбрионных линий, может свидетельствовать о важной роли этого стерина в процессах эмбриогенеза.

Полученные нами данные показывают, что биосинтез стерина у эмбрионных и неэмбрионных линий листовницы сибирской имеет отличительные особенности в отношении баланса 24-этилстерина ( $\beta$ -ситостерин) и 24-метилстерина (кампестерин).

Как уже говорилось выше, эфиры стерина неэмбрионных клеточных линий, в отличие от эмбрионных, характеризуются большим разнообразием. Во фракции эфиров стерина всех клеточных линий листовницы сибирской были обнаружены эфиры холестерина, кампестерина, стигмастерина,  $\beta$ -ситостерина в сравнительно небольшом количестве (табл. 3). Абсолютное их содержание представлено в табл. 4. Помимо стерина и их эфиров в процессе анализа был идентифицирован сквален – углеводород тритерпенового ряда (табл. 5). Содержание этого компонента в эмбрионных линиях листовницы сибирской было значительно, в 4 и более раз выше, чем в неэмбрионных. Сквален является важным предшественником в процессе биосинтеза стерина [8, 14]. Кроме того, благодаря неполярной природе и расположению в гидрофобном центре липидного бислоя, сквален увеличивает жесткость и размер клеточной мембраны, ее полярность и гидрофобные свойства, способствует восстановлению мембран, функциональной регуляции мембранных белков, транспорту ионов, обладая при этом антиоксидантными свойствами [37]. Можно предположить, что высокое содержание сквалена в эмбрионных клеточных линиях, обусловленное, вероятно, особенностями биосинтеза стерина в тканях каллусов с разной эмбрионностью, способно положительно влиять на мембранную структуру клеток, защищая их от окисления и способствуя тем самым нормальному прохождению процесса эмбриогенеза.

В неэмбрионных линиях листовницы сибирской во фракции эфиров стерина обнаружено соединение 9,10-секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3,25-триол (табл. 5), которое в своей структуре содержит только два циклогексановых кольца вместо четырех, характерных для стерина, и относится к классу терпеноидов [38]. Содержание этого соединения достаточно высокое – 16.2% (Кл23) и 29.6% (Кл31) от общего количества эфиров стерина. Исходя из структуры 9,10-секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3,25-триола, можно предположить, что это соединение является предшествен-

ником или побочным продуктом при биосинтезе стерина. В литературе имеются сведения об обнаружении этого соединения в семенах *Wrightia arborea* [39], экстрактах листьев *Terminalia catappa* [38] и др.

Анализ полученных результатов показывает, что содержание и качественный состав свободных стерина и их эфиров в культуре *in vitro* листовницы сибирской существенно различаются в клеточных линиях с разным эмбрионным потенциалом. Эмбрионные линии содержали значительно больше кампестерина – предшественника БС, для которого показана важная роль в морфогенезе [14], а неэмбрионные линии –  $\beta$ -ситостерина, высокое содержание которого многие авторы связывают с накоплением биомассы [21], но не с эмбриогенезом. Установлено, что клеточные линии листовницы сибирской, контрастные по способности к соматическому эмбриогенезу, демонстрировали значительные различия в соотношении двух основных растительных стерина –  $\beta$ -ситостерин/кампестерин. Известно, что это соотношение критически важно для функционального состояния клеточной мембраны, в том числе для упорядочивания жирнокислотных цепей в составе мембран, увеличения мембранной проницаемости для воды и ионов, а также для активности мембранно-связанных белков [8, 22]. Мы предполагаем, что установленные в экспериментах различия в соотношении  $\beta$ -ситостерин/кампестерин могут указывать на такие изменения мембранных свойств, которые играют важную роль в процессах дифференциации клеток при эмбриогенезе. В отношении “стрессового” стигмастерина, большое количество которого обнаружено у линии Кл10, имеющей нарушения в развитии зародышей, логично предположить, что его высокое содержание сопровождается и/или вызывает нарушение нормального развития эмбрионных структур листовницы сибирской. Высокое содержание в тканях эмбрионных линий сквалена, являющегося субстратом для биосинтеза стерина, может быть связано как с различиями в активности синтетических процессов в клеточных линиях *L. sibirica* с разной эмбрионностью, так и со структурными и антиоксидантными функциями этого соединения, которые могут способствовать эмбриогенезу.

Высокое содержание кампестерина в эмбрионных тканях клеточных линий *L. sibirica*, наряду с ранее установленным нами высоким содержанием в них моноеновых ЖК (в первую очередь, олеиновой) [5], вероятно, могут служить маркером эмбрионного потенциала этих линий для отбора перспективных для клонального размножения каллусов.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Био-

аналитика” СИФИБР СО РАН. Авторы выражают благодарность д.б.н., проф. И.Н. Третьяковой (Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск) за предоставление исходного растительного материала лиственницы сибирской.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез // Хвойные boreальной зоны. 2012. Т. 30. С. 180.
2. Tretiakova I.N. Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis in an vitro culture of Siberian larch // Dokl. Biol. Sci. 2013. V. 450. № 1. P. 139. <https://doi.org/10.1134/S0012496613030034>
3. Joy R.W., Yeung E.C., Kong L., Thorpe T. Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 1991. V. 27. P. 32.
4. Tranvan H.O.A., Troton D., Calvayrac R. Morphological, histological and lipid changes during adventitious budding in *Pinus pinaster* cultured cotyledons // J. Exp. Bot. 1988. V. 39. № 7. P. 907. <https://doi.org/10.1093/jxb/39.7.907>
5. Makarenko S.P., Shmakov V.N., Dudareva L.V., Stolbikova A.V., Semenova N.V., Tret'yakova I.N., Konstantinov Yu.M. Fatty acid composition of total lipids in embryogenic and nonembryogenic callus lines of larch // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. № 2. P. 252. <https://doi.org/10.1134/S1021443716020102>
6. Семёнова Н.В., Шмаков В.Н., Пак М.Э., Третьякова И.Н., Константинов Ю.М., Дударева Л.В. Особенности состава нейтральных липидов эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. // Биологические мембраны. 2020. Т. 37. С. 215. <https://doi.org/10.31857/S0233475520020127>
7. Semenova N.V., Shmakov V.N., Konstantinov Yu.M., Dudareva L.V. Phospholipids of embryogenic and non-embryogenic cell lines of *Larix sibirica* Ledeb. // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 1076. <https://doi.org/10.1134/S1021443720060151>
8. Valitova J.N., Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 819. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
9. Kreis W., Muller-Uri F. Biochemistry of sterols, cardiac glycosides, brassinosteroids, phytoecdysteroids and steroid saponins // Ann. Plant Rev. 2010. V. 40. P. 304. <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch6>
10. Willmann M.R. Sterols as regulators of plant embryogenesis // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. № 10. P. 416. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)91717-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)91717-5)
11. Hartmann M.A. Plant sterols and the membrane environment // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. № 5. P. 170. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01233-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01233-3)
12. Senthil-Kumar M., Wang K., Mysore K.S. AtCYP710A1 gene mediated stigmastanol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Plant Signal. Behav. 2013. V. 8. № 2. P. e23142-1. <https://doi.org/10.4161/psb.23142>
13. Schaller H. The role of sterols in plant growth and development // Prog. Lipid Res. 2003. V. 42. № 3. P. 163. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00047-4)
14. Bajguz A., Chmur M., Gruszka D. Comprehensive overview of the Brassinosteroid biosynthesis pathways: substrates, products, inhibitors, and connections // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 1034. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01034>
15. Clouse S.D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development // Plant Cell. 2011. V. 23. № 4. P. 1219. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
16. Tian X., Xuan L., Liu B., Hu T., Wang C., Wang X. Effects of heterologous expression of *Populus euphratica* brassinosteroids biosynthetic enzyme genes *CPD* (*PeCPD*) and *DWF4* (*PeDWF4*) on tissue dedifferentiation and growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2018. V. 132. № 1. P. 111. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1316-2>
17. Nolan T., Chen J., Yin Y. Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses // Biochem. J. 2017. V. 474. № 16. P. 2641. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160633>
18. Zu S.H., Jiang Y.T., Hu L.Q., Zhang Y.J., Chang J.H., Xue H.W., Lin W.H. Effective modulating Brassinosteroids signal to study their specific regulation of reproductive development and enhance yield // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00980>
19. Schrick K., Mayer U., Martin G., Bellini C., Kuhnt C., Schmidt J., Jurgens G. Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of *Arabidopsis* // Plant J. 2002. V. 31. № 1. P. 61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01333.x>
20. Schrick K., Cordova C., Li G., Murray L., Fujioka S. A dynamic role for sterols in embryogenesis of *Pisum sativum* // Phytochem. 2011. V. 72. № 6. P. 465. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.009>
21. Cunha A., Ferreira M.F. Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax // Plant Sci. 1997. V. 124. P. 97. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)04587-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)04587-1)
22. Zur I., Skoczowski A., Niemczyk E., Dubert F. Changes in the composition of fatty acids and sterols of membrane lipids during induction and differentiation of *Brassica napus* (var. oleifera L.) callus // Acta Physiol. Plant. 2002. V. 24. № 1. P. 3. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0015-7>
23. Silvestro D., Andersen T.G., Schaller H., Jensen P.E. Plant sterol metabolism.  $\Delta^7$ -Sterol-C5-desaturase (STE1/DWARF7),  $\Delta^5,7$ -sterol- $\Delta^7$ -reductase (DWARF5) and  $\Delta^{24}$ -sterol- $\Delta^{24}$ -reductase (DIMINUTO/DWARF1) show multiple subcellular localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. // PLOS One. 2013. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056429>
24. Дударева Л.В., Семенова Н.В., Нохсоров В.В., Рудиковская Е.Г., Петров К.А. Компонентный состав фитостероидов надземной части хвоща пестрого

- Equisétum variegatum* Schleich. ex. Web., произрастающего в северо-восточной Якутии // Химия растительного сырья. 2020. № 2. С. 133.  
<https://doi.org/10.14258/jcprm.2020025555>
25. Uchida H., Ohyama K., Suzuki M., Yamashita H., Muranaka T., Ohyama K. Triterpenoid levels are reduced during *Euphorbia tirucalli* L. callus formation // Plant Biotechnol. 2010. V. 27. № 1. P. 105.  
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.27.105>
26. Chiu P.L., Bottino P.J., Patterson G.W. Sterol composition of nystatin and amphotericin B resistant tobacco calluses // Lipids. 1980. V. 15. № 1. P. 50.  
<https://doi.org/10.1007/BF02534118>
27. Deng S., Wei T., Tan K., Hu M., Li F., Zhai Y., Ye Sh., Xiao Y., Hou L., Luo M. Phytosterol content and the campesterol: sitosterol ratio influence cotton fiber development: role of phytosterols in cell elongation // Sci. China Life Sci. 2016. V. 59. № 2. P. 183.  
<https://doi.org/10.1007/s11427-015-4992-3>
28. Qian P., Han B., Forestier E., Hu Z., Gao N., Lu W., Shaller H., Li J., Hou S. Sterols are required for cell fate commitment and maintenance of the stomatal lineage in *Arabidopsis* // Plant J. 2013. V. 74. № 6. P. 1029.  
<https://doi.org/10.1111/tjp.12190>
29. Carland F.M., Fujioka Sh., Takatsuto S., Yoshida Sh., Nelson T. The identification of *CVPI* reveals a role for sterols in vascular patterning // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 2045.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.003939>
30. Ines C., Corbacho J., Paredes M.A., Labrador J., Cordeiro A.M., Gomez Jimenez M.C. Regulation of sterol content and biosynthetic gene expression during flower opening and early fruit development in olive // Physiol. Plant. 2019. V. 167. № 4. P. 526.  
<https://doi.org/10.1111/pp.12969>
31. Schaeffer A., Bouvier-Nave P., Benveniste P., Schaller H. Plant sterol-C24-methyl transferases: different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2 // Lipids. 2000. V. 35. № 3. P. 263.  
<https://doi.org/10.1007/s11745-000-0522-1>
32. Valitova J., Renkova A., Mukhitova F., Dmitrieva S., Beckett R.P., Minibayeva F.V. Membrane sterols and genes of sterol biosynthesis are involved in the response of *Triticum aestivum* seedlings to cold stress // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 142. P. 452.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.026>
33. Dyas L., Prescott M.C., Evershed R.P., Goad L.J. Steryl esters in a cell suspension culture of celery (*Apium graveolens*) // Lipids. 1991. V. 26. № 7. P. 536.  
<https://doi.org/10.1007/BF02536600>
34. Sharma P., Patil A., Patil D. Quantification of  $\beta$ -sitosterol from field grown plants and callus of *Crataeva tapia* L. // Int. J. Pharm. Sci. 2016. V. 7. № 4. P. 1556.  
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(4\).1556-63](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(4).1556-63)
35. Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., Пак М.Э. Продуктивность эмбрионных клеточных линий и их соматоклональная изменчивость у листовницы сибирской *in vitro* // Лесоведение. 2015. № 1. С. 27.
36. Sonawane P.D., Pollier J., Panda S., Szymanski J., Mas-salha H., Yona M., Unger T., Malitsky S., Arendt Ph., Pauwels L., Almekias-Siegl E., Rogachev I., Meir S., Cardenas P.D., Athar M. et al. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism // Nat. Plants. 2016. V. 3. № 1. P. 1.  
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.205>
37. Lozano-Grande M.A., Gorinstein S., Espitia-Rangel E., Dávila-Ortiz G., Martínez-Ayala A.L. Plant sources, extraction methods, and uses of squalene // Int. J. Agron. 2018. V. 2018. P. 1.  
<https://doi.org/10.1155/2018/1829160>
38. Iheagwam F.N., Israel E.N., Kayode K.O., De Campos O.C., Ogunlana O.O., Chinedu S.N. GC-MS analysis and inhibitory evaluation of *Terminalia catappa* leaf extracts on major enzymes linked to diabetes // Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2019. V. 2019. P. 1.  
<https://doi.org/10.1155/2019/6316231>
39. Nagalakshmi M.A.H., Murthy K.S.R. Phytochemical profile of crude seed oil of *Wrightia tinctoria* R. BR. and *Wrightia arborea* (DENNST.) MABB. by GC-MS // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2015. V. 31. P. 46.



## РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (*GDH1* И *GDH2*) В РЕГУЛЯЦИИ ИХ ЭКСПРЕССИИ В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ ГИПОКСИИ

© 2023 г. А. Т. Епринцев<sup>а</sup> \*, Г. Б. Анохина<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Воронежский государственный университет”, Воронеж, Россия

\*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 19.08.2022 г.

Исследована регуляция глутаматдегидрогеназы — фермента, принимающего участие как в азотном, так и в углеродном метаболизме, а также осуществляющего связь между циклом трикарбоновых кислот и шунтом  $\gamma$ -аминомасляной кислоты. Обнаружено, что индуцируемые дефицитом кислорода изменения в активности глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) заключаются в увеличении ее каталитической активности более чем в 2 раза. Методом ПЦР в реальном времени изучена дифференциальная экспрессия генов *GDH1* и *GDH2*, которые в геноме кукурузы кодируют  $\beta$ - и  $\alpha$ - субъединицы глутаматдегидрогеназы соответственно. Снижение относительного уровня транскриптов гена *GDH2* сопровождалось увеличением экспрессионной активности гена *GDH1*. Это, в свою очередь, предположительно, способствовало протеканию реакции аминирования 2-оксоглутарата. В составе промотора гена *GDH2* обнаружено наличие двух CpG-островков размером 404 и 383 п.н. Промотор гена *GDH1* не содержит ни одного CpG-островка, однако, в его составе нами было обнаружено 38% сайтов CpNpG и CpNpN от общего числа исследуемых динуклеотидов. Для оценки влияния степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов, входящих в состав промоторных областей генов *GDH1* и *GDH2* на их экспрессию в гипоксических условиях, был произведен сравнительный анализ динамики транскрипционной активности генов  $\beta$ - и  $\alpha$ - субъединиц глутаматдегидрогеназы от метильного статуса их промоторов. Обратное-пропорциональный характер наложения изменений в профиле метилирования промоторов генов *GDH1* и *GDH2* и трансформации уровня экспрессии этих генов показывает их корреляцию. Данные, полученные в результате проведения метил-специфичной ПЦР, свидетельствуют о том, что повышение доли метилированных CpG-динуклеотидов приводит к снижению количества мРНК гена *GDH2*, в то время как уменьшение этой величины для гена *GDH1* вызывает индукцию его функционирования. Метилирование промоторных областей генов глутаматдегидрогеназы регулирует их транскрипционную активность в листьях кукурузы *in vivo* в условиях дефицита кислорода. Таким образом, немногочисленные данные о молекулярных механизмах регуляции синтеза изоферментов глутаматдегидрогеназы были дополнены получением новых результатов о роли степени метилирования промоторов генов *GDH1* и *GDH2* глутаматдегидрогеназы в их дифференциальной экспрессии при адаптации кукурузы к гипоксии.

**Ключевые слова:** *Zea mays*, глутаматдегидрогеназа, гипоксия, метилирование, промотор, CpG-островки, экспрессия, эпигенетика

**DOI:** 10.31857/S0015330322600425, **EDN:** GKJXTQ

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что связь между циклом трикарбоновых кислот и шунтом  $\gamma$ -аминомасляной кислоты активируется в ответ на действие некоторых абиотических стрессов и осуществляется посред-

ством изменения функционирования глутаматдегидрогеназы. Этот фермент располагается на важном участке пересечения азотного и углеводного метаболизмов [1–3].

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, L-глутамат: НАД(Ф)-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.3), катализируя обратимое дезаминирование глутамата, является олигомером и может состоять из субъединиц различного типа:  $\alpha$ ,  $\beta$  и, как показано для *Arabidopsis thaliana*,  $\gamma$  [4]. Известно, что преобладание  $\alpha$ -субъединиц в структуре обеспечивает более вы-

**Сокращения:** ГДГ — глутаматдегидрогеназа, ГОГАТ — глутамин-2-оксоглутаратаминотрансфераза, ГАМК —  $\gamma$ -аминомасляная кислота, ГС — глутамин-синтаза, МС-ПЦР — метил-специфичная полимеразная цепная реакция, 2ОГ — 2-оксоглутарат; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот, ЭТЦ — электрон-транспортная цепь.

сокое сродство к глутамату, в то время как наличие  $\beta$ -субъединиц повышает сродство к 2-оксоглутарату [4]. *In vivo* отдельные субъединицы связываются в различных соотношениях с образованием гомо- и гетерогексамеров  $\sim 270$  кДа [5–8]. В животных клетках ГДГ присутствует преимущественно в виде димеров и тетрамеров, в то время как у ряда бактерий и растений обнаруживаются преимущественно гексамерные формы. Гексамеры глутаматдегидрогеназы имеют существенное сходство в структуре, независимо от коферментной специфичности [9]. ГДГ растений является гетерогенным ферментом, и степень его гетерогенности зависит от вида растений и локализации [10]. Существование тканеспецифичных изоформ ГДГ может быть связано с клеточной дифференцировкой, субклеточным компартментом или физиологической функцией. Предполагается, что разные изоформы ГДГ могут быть вовлечены в анаболические и катаболические процессы [11].

У растений и микроорганизмов физиологическая роль ГДГ включает ассимиляцию азота, катаболизм глутамата, а также поддержание осмотического баланса и устойчивость к высоким температурам. Также данный фермент является промежуточным звеном между циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) и шунтом  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК-шунтом). Известно, что продукт реакции, катализируемой ГДГ – 2-оксоглутарат – может быть введен в цикл лимонной кислоты и использован для энергизации клетки [12].

У кукурузы глутаматдегидрогеназа кодируется двумя генами [13]. Ген *GDH1* (LOC542220), кодирующий  $\beta$ -субъединицу глутаматдегидрогеназы кукурузы, локализован в первой хромосоме [14]. Ген *GDH2* (LOC100193614) находится в 10 хромосоме и кодирует  $\alpha$ -субъединицу ГДГ кукурузы.

Имеются доказательства того, что роль ГДГ в прямой ассимиляции  $\text{NH}_4^+$  незначительна (5%) по сравнению с вкладом глутаминсинтетазы и глутаминоксоглутаратаминотрансферазы (цикл ГС-ГОГАТ) (95%) [15]. Однако ГДГ обеспечивает альтернативный путь включения аммиака в органические соединения только во время определенных экологических стимулов, когда требуется ремобилизация питательных веществ [16]. Основная роль ГДГ заключается в подпитке цикла трикарбоновых кислот 2ОГ, когда углерод становится ограничивающим фактором [7]. Таким образом, вместе с глутамин-2-оксоглутаратаминотрансферазой (ГОГАТ), глутаматдегидрогеназа участвует в образовании и гомеостазе глутамата [17]. По этой причине фермент играет важную роль в точке разветвления путей ассимиляции углерода и азота [3].

Дефицит кислорода приводит к ингибированию ЦТК, что связано, в первую очередь, с тем, что электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий в

отсутствии основного акцептора электронов – кислорода, не способна нормально функционировать. Во время гипоксии, когда цепь переноса электронов не окисляет восстанавливающие эквиваленты, некоторые сегменты ЦТК все же остаются работоспособными и катализируют реакции в противоположных направлениях. Это служит для использования высокоэнергетических фосфатов посредством фосфорилирования на уровне матричного субстрата в отсутствие окислительного фосфорилирования [18].

Ранее нами было показано, что 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (2ОГДК), который катализирует лимитирующую и самую высокоэнергичную стадию ЦТК, в условиях дефицита кислорода инактивируется [19]. Однако непонятным остается механизм, который обеспечивает адаптацию клеточного метаболизма в этих условиях. Регулирующая роль в данном процессе может принадлежать глутаматдегидрогеназе, которая за счет изменения субъединичного состава контролирует поток 2-оксоглутарата между азотным и углеродным метаболизмом: увеличение  $\alpha$ -субъединиц в структуре фермента способно приводить к смещению равновесия реакции в сторону дезаминирования глутамата, а преобладание  $\beta$ -субъединиц способствует протеканию реакции аминирования 2-оксоглутарата [4].

Существуют убедительные доказательства того, что изменение уровня  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) регулирует функционирование ЦТК, который обеспечивает энергизацию клетки для поддержания энергозатратной реакции адаптации к абиотическим стрессам, в том числе и к гипоксии [20]. В связи с этим целью работы являлось исследование роли метилирования промоторов генов *GDH1* и *GDH2* глутаматдегидрогеназы в регуляции их экспрессии в листьях кукурузы (*Zea mays* L) при гипоксии, а также выявление механизмов трансформации метаболических потоков при адаптивной реакции клеточного метаболизма в условиях дефицита кислорода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследований использовались 10–12-дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76, выращивание которых осуществляли гидропонно при 10-часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м<sup>2</sup> (климатическая камера “LabTech”, Корея) и температурой окружающей среды 25°C.

Растения предварительно помещали в вакуум-эксикаторы на 24 ч без доступа света, после чего в эксикатор с опытной группой растений в течение суток подавался азот из баллона 10150У (ГОСТ 94973, Россия, УЗГПО) со средней скоростью 18 см<sup>3</sup>/сек. Контрольная группа находи-

**Таблица 1.** Праймеры к генам глутаматдегидрогеназы

| Ген          | Праймер  | Нуклеотидная последовательность | Температура отжига, С |
|--------------|----------|---------------------------------|-----------------------|
| <i>GDH1</i>  | Прямой   | GCGGAGAACAAGGGGATCAA            | 58                    |
|              | Обратный | ACAGGATCTCGTCTGCCTCT            |                       |
| <i>GDH-2</i> | Прямой   | TGATCCAGAGGCAGACGAGA            | 58                    |
|              | Обратный | GTAATGCGCGGTCAATGGTC            |                       |

лась в среде, куда непрерывно осуществлялся приток кислорода воздуха.

Согласно сертификату соответствия содержание кислорода в баллоне с азотом составляло  $\leq 0.5\%$ . Температура окружающей среды во время эксперимента поддерживалась на уровне  $25^\circ\text{C}$ . Первые образцы (“нулевой контроль”) для исследования изымали до начала эксперимента.

**Экстракция фракции митохондрий** из листьев кукурузы осуществлялась путем гомогенизации образцов в ледяной среде выделения, включающей:  $0.15\text{ M Tris-HCl}$  буфер (pH 7.4),  $0.4\text{ M}$  сахароза,  $2.5\text{ mM}$  динатриевая соль ЭДТА,  $1\text{ mM KCl}$ ,  $4\text{ mM MgCl}_2$ ,  $0.05\%$  Triton X-100 в соотношении 1 : 10. Гомогенат фильтровали и осаждали клеточные стенки 3 мин при  $3000\text{ g}$  (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Надосадочную жидкость центрифугировали при  $12000\text{ g}$  в течение 20 мин при температуре  $+4^\circ\text{C}$ . Супернатант удаляли, а осадок растворяли в 2 мл среды ресуспендирования, включавшей  $0.15\text{ M Tris-HCl}$  буфер (pH 7.4) и  $2.5\text{ mM}$  динатриевую соль ЭДТА.

**Активность ГДГ по реакции аминирования** определяли спектрофотометрически при  $340\text{ nm}$  в среде, содержащей  $13\text{ mM}$  2-оксоглутарата,  $0.25\text{ mM}$  НАДН,  $1\text{ mM CaCl}_2$ ,  $50\text{ mM}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $100\text{ mM}$   $\text{Tris-HCl}$  буфер pH 8.0 [21]. За единицу ферментативной активности глутаматдегидрогеназы принимали такое количество фермента, которое катализировало превращение  $1\text{ мкмоль}$  2-оксоглутарата за 1 мин при  $25^\circ\text{C}$  при оптимальном значении pH (8.0). Значения общей ферментативной активности рассчитывали, как отношение количества ферментативных единиц на г/сырой массы листьев кукурузы.

Суммарная РНК и ДНК выделялись методом фенол-хлороформной экстракции [23, 24]. Выделение ДНК осуществлялось путем лизиса растительной ткани в буфере, содержащем:  $2\%$  цетримониум бромид,  $1.4\text{ M NaCl}$ ,  $20\text{ mM}$  ЭДТА,  $0.1\text{ M}$   $\text{Tris-HCl}$  (pH 8.0) с последующим центрифугированием (3 мин при  $5000\text{ об/мин}$ ). К надосадку добавляли смесь фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25 : 24 : 1) и центрифугировали при  $13000\text{ об/мин}$  в течение 20 мин. Нуклеиновые кислоты из водной фазы осаждали  $3\text{ M}$  ацетатом натрия и тремя объемами  $96\%$  этанола с последующей инкубацией при  $-20^\circ\text{C}$ . Полученный оса-

док промывали  $75\%$  этанолом, высушивали и растворяли в воде, свободной от ДНКаз.

Выделение РНК проводили путем гомогенизации растительной ткани в соотношении 1 : 10 с буфером выделения ( $4\text{ M}$  гуанидин тиоционат,  $25\text{ mM}$  цитрат натрия (pH 7.0),  $0.5\%$  (вес/объем) N-лаурисилсаркозин и  $0.1\text{ M}$   $\beta$ -меркаптоэтанол). К надосадку, полученному в ходе 3 мин центрифугирования ( $5000\text{ об/мин}$ ), добавляли смесь фенола : хлороформа (49 : 1) и центрифугировали при  $13000\text{ об/мин}$  20 мин. Осаждение нуклеиновых кислот из водной фазы проводили путем добавления  $2\text{ M}$  ацетата натрия (pH 4.0) и 1 мл изопропанола. Осажденную РНК промывали в  $80\%$  этаноле, высушивали и растворяли в воде, свободной от ДНКаз. Добавление равного объема  $12\text{ M}$  хлорида лития и последующая инкубация при  $-20^\circ\text{C}$  обеспечивали очистку РНК от ДНК. Все манипуляции проводили при  $+4^\circ\text{C}$ , если не указано иное.

**ПЦР в реальном времени** проводили на приборе LightCycler96 (“Roche”, Швеция) с использованием в качестве интеркалирующего красителя SYBR Green I. В качестве матрицы использовали кДНК, полученную в ходе реакции обратной транскрипции с набором MMLV-RT Kit (ЗАО “Евроген”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Количество РНК-матрицы составляло  $2\text{ мкг}$ . Специфические праймеры к генам *GDH1* и *GDH2* представлены в таблице 1. Количественный контроль матрицы осуществляли путем параллельной амплификации образцов с праймерами к гену *EF-1 $\alpha$* . В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с применением  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -метода.

**Анализ промоторов** исследуемых генов на наличие CpG-островков и подбор праймеров для метил-специфичной ПЦР (табл. 2) осуществляли с помощью онлайн-сервиса MethPrimer ([www.uog-gene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi](http://www.uog-gene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi)).

Степень метилирования отдельных CpG-динуклеотидов определяли путем проведения метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) с последующей детекцией полученных ампликонов методом электрофореза в  $2\%$  агарозном геле (Helicon, Россия) с добавлением бромистого этидия (Sigma Aldrich, США). В качестве матрицы для проведения

Таблица 2. Праймеры для метил-специфичной ПЦР к генам *GDH1* и *GDH-2*

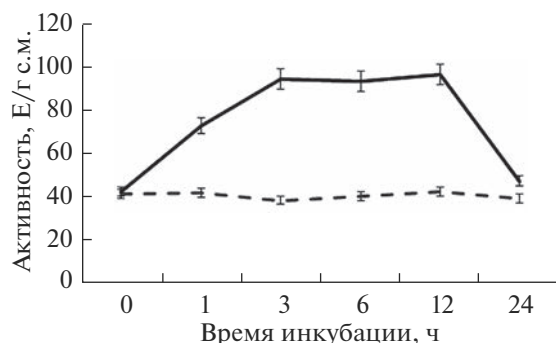
| Ген          | Название   | Положение исследуемого цитозина |      | Последовательность        | Температура отжига, °С |
|--------------|------------|---------------------------------|------|---------------------------|------------------------|
|              |            |                                 |      |                           |                        |
| <i>GDH1</i>  | Прямой М   | 1                               | -779 | ATTTGTAGATTTAATCGGTTGGGT  | 52–53                  |
|              | Обратный М |                                 |      | AAAAACTAAAATCACTATTCTCGTT |                        |
|              | Прямой U   |                                 |      | ATTTGTAGATTTAATTGGTTGGGT  |                        |
|              | Обратный U |                                 |      | AAAAACTAAAATCACTATTCTCATT |                        |
|              | Прямой М   | 2                               | -419 | TCGTAGTAATTTTTGTTTTGTGG   | 52–53                  |
|              | Обратный М |                                 |      | AAAAACTAAAATCACTATTCTCGTT |                        |
|              | Прямой U   |                                 |      | TTGTAGTAATTTTTGTTTTGTGG   |                        |
|              | Обратный U |                                 |      | AAAAACTAAAATCACTATTCTCATT |                        |
|              | Прямой М   | 3                               | -340 | TAAGATTGTATATTTTCGGTGGTAT | 52–53                  |
|              | Обратный М |                                 |      | AAAAACTAAAATCACTATTCTCGTT |                        |
|              | Прямой U   |                                 |      | TAAGATTGTATATTTTGGTGGTAT  |                        |
|              | Обратный U |                                 |      | AAAAACTAAAATCACTATTCTCATT |                        |
| <i>GDH-2</i> | Прямой М   | 1                               | -304 | AGATAAGTTAGTTATGGGATGGGC  | 53                     |
|              | Обратный М |                                 |      | TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA |                        |
|              | Прямой U   |                                 |      | AGATAAGTTAGTTATGGGATGGGTG |                        |
|              | Обратный U |                                 |      | TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA |                        |
|              | Прямой М   | 2                               | -263 | GGTAAGTGGACGGAAAAGGA      | 53                     |
|              | Обратный М |                                 |      | TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA |                        |
|              | Прямой U   |                                 |      | GGTAAGTGGATGGAAAAGGA      |                        |
|              | Обратный U |                                 |      | TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA |                        |
|              | Прямой М   | 3                               | -185 | GGTTCGGTTTAGTTTTGAAATAAT  | 53                     |
|              | Обратный М |                                 |      | TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA |                        |
|              | Прямой U   |                                 |      | GGTTCGGTTTAGTTTTGAAATAAT  |                        |
|              | Обратный U |                                 |      | TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA |                        |

МС-ПЦР использовали ДНК, подвергнутую модификации бисульфитом натрия.

**Конверсия ДНК** проводилась в три этапа с использованием бисульфита натрия в качестве основного модифицирующего агента [22]. На первом этапе, предварительно денатурированная ДНК (инкубация при 55°C в присутствии 0.3 М NaOH) модифицировалась путем добавления смеси 4 М раствора NaHSO<sub>3</sub> и 0.2 М гидрохинона с последующей инкубацией в темноте при 55°C. На втором этапе происходила очистка модифицированной ДНК от бисульфита натрия с использованием набора DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen, Германия). Десульфитирование осуществляли путем инкубации с 0.3 М NaOH при 37°C. Для осаждения ДНК из раствора добавляли гликоген в концентрации 20 мг/мл, 10 М ацетата аммония и 3 объема 80% этанола. Отмывка нуклеиновой кислоты происходила с применением 80% этанола, после чего

ДНК высушивали и растворяли в воде, свободной от ДНКаз.

**Статистический анализ.** Опыт проводился в 3–4-кратной повторности, аналитические определения активности глутаматдегидрогеназы для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Метил-специфичную ПЦР с каждым из образцов проводили в трех аналитических повторностях. Постановку ПЦР в реальном времени проводили трижды. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты на графиках выражали как среднее значение. Бары на графиках представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM). Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента [25, 26]. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (влияние фактора досто-



**Рис. 1.** Изменение общей ферментативной активности ГДГ в условиях действия гипоксии. Сплошная черная линия — опытная группа растений, инкубация которых осуществлялась в гипоксической среде с азотом; пунктирная серая линия — контрольная группа растений, инкубация которой осуществлялась в нормоксических условиях. Различия между контролем ( $O_2$ ) и опытом ( $N_2$ ) статистически значимы ( $P < 0.05$ ). Представлены данные не менее трех независимых экспериментов.

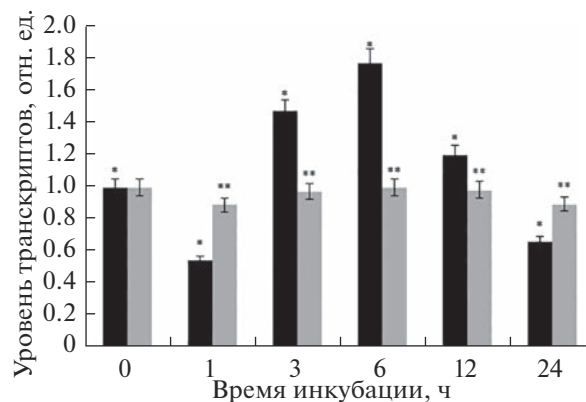
верно при  $P < 0.05$ ). Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках проведенного исследования было изучено влияние гипоксии на общую ферментативную активность ГДГ, что позволило обнаружить активацию данной ферментной системы (рис. 1). В первый час гипоксического воздействия в листьях кукурузы наблюдали существенное увеличение (более чем в 1.5 раза) активности ГДГ по реакции аминирования, которое сохранялось на протяжении 12 ч. Максимум активности был зафиксирован на 12 ч инкубации. Спустя сутки эксперимента значения общей ферментативной активности ГДГ снижались практически до уровня контрольной группы.

Для установления механизма, регулирующего активность ГДГ в данных условиях, было проведено исследование транскрипционной активности генов, которые в геноме кукурузы кодируют  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединицы глутаматдегидрогеназы.

Было установлено, что транскрипция гена *GDH1* при инкубации растений в среде с низким содержанием кислорода первоначально снижается в 2 раза, что, однако, к третьему часу сменяется активацией работы данного гена (рис. 2). К 6 ч эксперимента относительный уровень транскриптов *GDH1* достигает своего максимума, превышая контрольные значения более чем в 1.5 раза. В последующие часы концентрация мРНК данного гена постепенно снижается. Следует отметить, что в контрольной группе растений относительный уровень транскриптов гена *GDH1* практически не

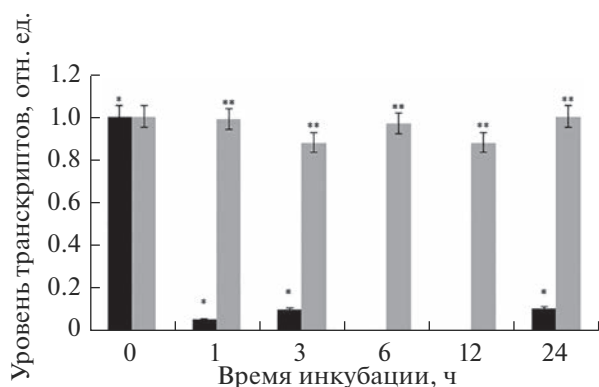


**Рис. 2.** Относительный уровень транскриптов гена *GDH1* в условиях действия гипоксии. Черные столбцы — опытная группа растений, инкубация которых осуществлялась в гипоксической среде с азотом; серые столбцы — контрольная группа растений, инкубация которой осуществлялась в нормоксических условиях. Различия между контролем ( $O_2$ ) и опытом ( $N_2$ ) статистически значимы. Представлены результаты четырех независимых экспериментов. Данные достоверно различаются: \* —  $P < 0.05$  по сравнению с контролем соответствующего часа эксперимента; \*\* —  $P < 0.03$  по сравнению с результатами, полученными до начала эксперимента (“нулевой контроль”).

изменялся (изменения в пределах колебаний) на протяжении всего времени эксперимента.

Проведенное исследование динамики относительного уровня транскриптов гена, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу ГДГ — *GDH2* показало, что уже в первые часы инкубации растений в среде, с низкой концентрацией кислорода происходила инактивация экспрессии гена (рис. 3). Интересно отметить, что на 6 ч гипоксического воздействия зарегистрировано минимальное значение уровня мРНК данного гена, что в некотором смысле коррелирует с максимумом транскрипционной активности гена *GDH1*. На протяжении всего времени эксперимента содержание транскриптов гена *GDH2*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу ГДГ остается на достаточно низком уровне, более чем в 9 раз ниже значений, отмеченных в контрольной группе растений.

В связи с тем, что активность некоторых ферментов регулируется на биохимическом, молекулярно-генетическом и эпигенетическом уровнях, [27–29] было проведено исследование роли метилирования в изменении каталитической активности глутаматдегидрогеназы при адаптивной реакции растительной клетки к гипоксии в листьях кукурузы. Предварительный анализ нуклеотидных последовательностей генов семейства *GDH* на наличие CpG-островков показал, что промотор гена *GDH1* не содержит ни одного CpG-островка, в то время как в составе промоторной области гена *GDH2* обнаружено два островка разме-



**Рис. 3.** Динамика относительного уровня транскриптов *GDH2* при гипоксии. Черные столбцы – опытная группа растений, инкубация которых осуществлялась в гипоксической среде с азотом; серые столбцы – контрольная группа растений, инкубация которой осуществлялась в нормоксических условиях. Различия между контролем ( $O_2$ ) и опытом ( $N_2$ ) статистически значимы. Представлены результаты четырех независимых экспериментов. Данные достоверно различаются: \* –  $P < 0.05$  по сравнению с контролем соответствующего часа эксперимента; \*\* –  $P < 0.03$  по сравнению с результатами, полученными до начала эксперимента (“нулевой контроль”).

ром 404 и 383 п.н. (рис. 4). Анализ промоторной области гена *GDH1* на наличие сайтов CpNpG и CpNpN, по которым в растительных организмах также осуществляется метилирование цитозинов [30], позволил установить, что исследуемый участок промотора размером 1000 п.н. содержит около 24.9% CpNpN-сайтов (от общего числа исследуемых нуклеотидов) и 13.8% приходится на сайты CpNpG.

Полученные в результате проведенной метил-специфичной ПЦР данные позволили выявить корреляцию между динамикой транскрипционной активности генов семейства *GDH* и модуляциями в метильном статусе исследуемых CpG-динуклеотидов.

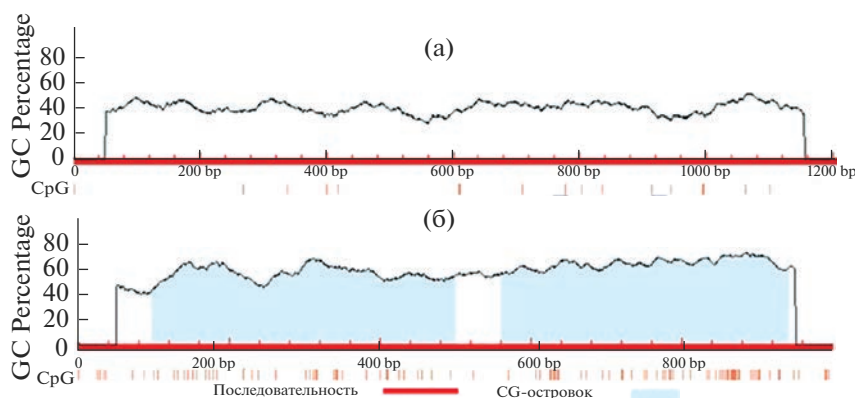
Установлено, что инкубация растений кукурузы в среде с низким содержанием кислорода приводит к снижению количества метилированных цитозинов в промоторе гена *GDH1*, что сопровождается увеличением его транскрипционной активности – до начала эксперимента 50% от количества всех проанализированных CpG-динуклеотидов обладали метильной группой, однако, по истечении третьего часа гипоксического воздействия 25% исследуемых цитозинов находились уже в деметилированном состоянии (рис. 5). У растений, находившихся в нормоксических условиях, степень метилирования составляла 50% на протяжении всего времени эксперимента (рис. 6).

Инактивация гена *GDH2* с первого часа нахождения в условиях дефицита кислорода была обусловлена метилированием CpG-динуклеотидов в составе его промотора до 75% (рис. 7). Увеличение доли метилированных цитозинов у контрольной группы растений не наблюдалось – степень метилирования промотора в условиях нормоксии составляла 25% (рис. 8).

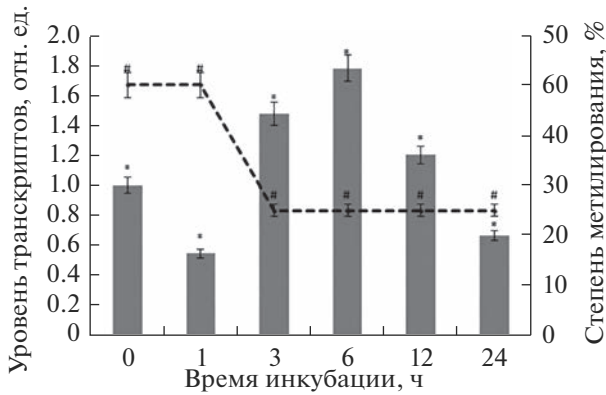
Таким образом, разнонаправленные модуляции в метильном статусе исследуемых CpG-динуклеотидов промоторов генов *GDH1* и *GDH2* в условиях действия гипоксического стресса, сопряженные с изменением их транскрипционной активности, указывают на существенную роль эпигенетического механизма в регуляции работы глутаматдегидрогеназной активности.

### ОБСУЖДЕНИЕ

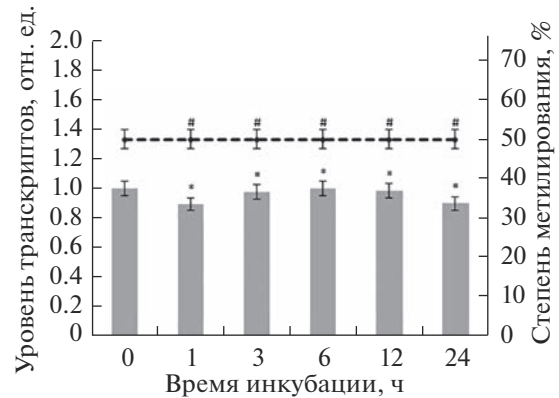
Известно, что снижение концентрации кислорода запускает механизм гипоксического ответа, который обеспечивает ингибирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса [19]. 2ОГ, который в виду инактивации 2ОГДК не способен метаболизироваться до сукцинил-СоА, направляется через альтернативный путь для компенсации или же нивелирования негативного влияния



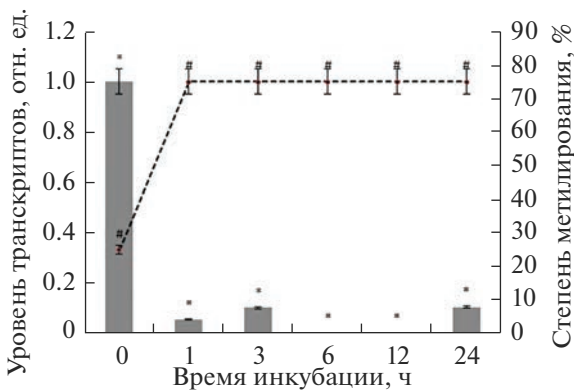
**Рис. 4.** Анализ промотора гена *GDH1* (А) и *GDH2* (Б) на наличие CpG-островков. Голубым цветом отмечены CpG – островки. Красными вертикальными полосками указаны положения CpG-динуклеотидов.



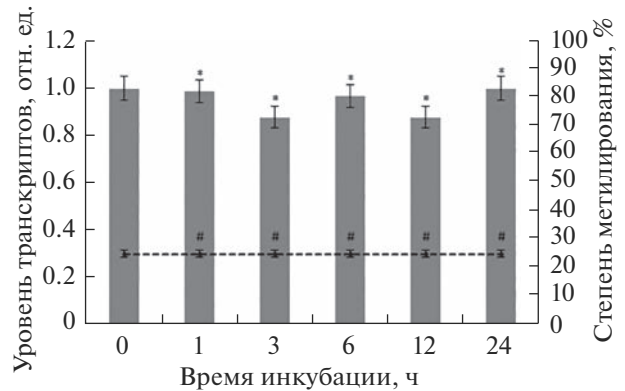
**Рис. 5.** Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH1* от степени метилирования (5mC) его промотора в условиях дефицита кислорода ( $N_2$ ). Представлены результаты четырех независимых экспериментов. Данные достоверно различаются: \* –  $P < 0.05$  по сравнению с контролем; # –  $P < 0.03$  по сравнению с контролем.



**Рис. 6.** Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH1* от степени метилирования его промотора в нормоксических условиях. Представлены результаты четырех независимых экспериментов. Данные достоверно различаются: \* –  $P < 0.05$  по сравнению с результатами, полученными до начала эксперимента (“нулевой контроль”); # –  $P < 0.03$  по сравнению с результатами, полученными до начала эксперимента (“нулевой контроль”).



**Рис. 7.** Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH2* от степени метилирования его промотора в условиях дефицита кислорода. Представлены результаты четырех независимых экспериментов. Данные достоверно различаются: \* –  $P < 0.05$  по сравнению с контролем; # –  $P < 0.03$  по сравнению с контролем.



**Рис. 8.** Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH2* от степени метилирования его промотора в нормоксических условиях. Представлены результаты четырех независимых экспериментов. Данные достоверно различаются: \* –  $P < 0.05$  по сравнению с “нулевым контролем”; # –  $P < 0.03$  по сравнению с “нулевым контролем”.

стрессора [20]. В работе показано, что увеличение активности глутаматдегидрогеназы в первые часы гипоксического воздействия связано с интенсификацией синтеза глутамата, который, являясь первичной аминокислотой, обеспечивает поставку аминокрупп для азотного метаболизма и связь между ЦТК и ГАМК-шунтом. Выявленная индукция гена *GDH1* способствует синтезу  $\beta$ -субъединицы, что обеспечивает смещение равновесия реакции в сторону аминирования 2-оксоглутарата. Образовавшийся глутамат может служить субстратом для ГАМК-шунта, который, как известно, активируется в ответ на действие некоторых

стрессоров [31]. Это предположение подтверждает тот факт, что при гипоксии транскрипция гена *GDH2*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу в геноме *Zea mays*, практически полностью инактивируется, тем самым “перекрывая” поток 2ОГ в сторону ЦТК [32]. Как уже упоминалось, важную роль в адаптации клетки к гипоксии играет азотный метаболизм. Ранее было высказано предположение, что адаптивный ответ метаболизма аминокислот на стресс, вызванный дефицитом кислорода, состоит из согласованной модуляции потока органического азота, проходящего через глутамат и аланин [33]. Следовательно, пути потребления

АТФ, которые участвуют в биосинтезе глутамина и аспарагина, подавляются в пользу аланина и ГАМК, которые обычно накапливаются, представляя основной пул органического азота [34]. Модуляции аминокислотных путей являются результатом регуляции некоторых ферментов, в том числе и участников ГАМК-шунта. Шунт ГАМК вносит свой вклад в клеточный рН-статус, поскольку декарбоксилирование глутамата является реакцией потребления протонов, которая увеличивает рН [34].

ГДГ играет в адаптивном процессе к действию гипоксии значительную роль. Механизм регуляции работы данного фермента требует отдельного изучения, так как установленный характер функционирования фермента нуждается в “тонкой настройке” для быстрого переключения из ингибированного состояния в активное во время перехода от низкого кислородного стресса к периоду пост-стрессорного восстановления.

Известно, что активность ферментных систем может регулироваться на биохимическом, молекулярно-генетическом и эпигенетическом уровнях. Однако особая роль принадлежит эпигенетическим механизмам регуляции работы генома, что необычайно важно в контексте исследования адаптивной реакции к действию абиотических стрессов. Многие исследования показали, что эпигенетическая изменчивость может быть важным механизмом адаптации к разным средам обитания [27]. Более того, имеется множество данных, свидетельствующих об изменении степени метилирования как всего генома, так и его отдельных участков, индуцированных стрессовым воздействием [27]. Ряд ферментов дыхательного метаболизма подвержен регуляции посредством процессов метилирования/деметиления CpG-динуклеотидов в составе промоторов соответствующих генов [28, 29].

Анализ нуклеотидных последовательностей промоторных областей генов *GDH1* и *GDH2* выявил в их структуре различия. Так, промотор гена *GDH1* не содержит CpG-островков, однако в его составе было обнаружено порядка 38% сайтов CpNpG и CpNpN, по которым возможно присоединение метильных групп к цитозину у растительных организмов, наряду с CpG-динуклеотидами. Главное отличие структуры промотора гена *GDH2* состоит в наличии двух CpG-островков размером 404 и 383 п.н. Ввиду того, что в промоторе гена присутствуют CpG-островки, можно предположить возможную регуляцию работы данного гена посредством метилирования. Однако отсутствие CpG-островков не говорит о невозможности регуляции работы гена посредством изменения метильного статуса [30]. Дело в том, что у растительных организмов, в отличие от животных, метилирование цитозина возможно не только по сайтам CpG, но также по сайтам CpNpG

и CpNpN, где N – A, T или C [30]. Несмотря на то, что CpG-островки обнаружены лишь в промоторе одного гена, была выявлена зависимость между степенью метилирования отдельных CpG-нуклеотидов и изменением экспрессии обоих исследуемых генов.

Показано, что при понижении концентрации кислорода в среде в листьях кукурузы происходят существенные изменения в статусе метилирования CpG-динуклеотидов, в промоторах генов субъединиц глутаматдегидрогеназы. Снижение количества метилированных CpG-динуклеотидов промотора гена *GDH1* приводило к росту его транскрипционной активности. В то же время, увеличение доли метилированных цитозинов инактивировало ген *GDH2*. Характер распределения динамики относительно уровня транскриптов генов, кодирующих  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединицы глутаматдегидрогеназы указывает на эпигенетический характер регуляции функционирования данного фермента в гипоксических условиях, что лишь в очередной раз подтверждает ключевую роль данного фермента в процессах адаптации клеточного метаболизма к изменяющимся условиям среды.

Таким образом, выявлена роль глутаматдегидрогеназы в механизме переключения метаболического пути 2-оксоглутарата с цикла трикарбоновых кислот, обеспечивающего энергизацию клетки, на альтернативный путь – шунт  $\gamma$ -аминомасляной кислоты. Вызванное понижением уровня кислорода в среде ингибирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, а также последующих ферментов, вероятно, запускает механизм индукции аминирующей активности глутаматдегидрогеназы. Существенное увеличение интенсивности функционирования ГДГ в первые 12 ч инкубации листьев кукурузы в гипоксических условиях обеспечивает перераспределение потоков углерода между циклом Кребса и ГАМК-шунтом. Механизм адаптивной реакции вызван дифференциальной экспрессией генов *GDH1* и *GDH2*, изменяющей соотношение  $\beta$ - и  $\alpha$ -субъединиц в молекуле фермента. Это, в свою очередь приводит к перераспределению потока 2-оксоглутарата между углеродным и азотным метаболизмом. При этом регуляция транскрипционной активности генов в условиях гипоксии осуществляется эпигенетически, за счет модуляций степени метилирования CpG-динуклеотидов промоторных областей генов *GDH1* и *GDH2*.

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

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания ВУЗам в



сфере научной деятельности на 2023–2025 г., проект № FZGU-2023-0009.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xiaochuang C., Meiyang W., Chunquan Z., Chu Z., Junhua Z., Lianfeng Z., Lianghuan W., Qianyu J. Glutamate dehydrogenase mediated amino acid metabolism after ammonium uptake enhances rice growth under aeration condition // *Plant Cell Reports*. 2020. V. 39. P. 363. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02496-w>
2. Godsora B.K.J., Prakash P., Punekar N.S., Bhaumik P. Molecular insights into the inhibition of glutamate dehydrogenase by the dicarboxylic acid metabolites // *Proteins*. 2022. V. 90. P. 810. <https://doi.org/10.1002/prot.26276>
3. Grzechowiak M., Sliwiak J., Jaskolski M., Ruszkowski M. Structural studies of glutamate dehydrogenase (isoform 1) from *Arabidopsis thaliana*, an important enzyme at the branch-point between carbon and nitrogen metabolism // *Front. Plant Sci*. 2020. V. 11. P. 754. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00754>
4. Purnell M.P., Botella J.R. Tobacco isoenzyme 1 of NAD (H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo // *Plant Physiol*. 2007. V. 143. P. 530. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091330>
5. Turano F.J., Thakkar S.S., Fang T., Weisemann J.M. Characterization and expression of NAD (H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 1997. V. 113. P. 1329. <https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1329>
6. Fontaine J.X., Tercé-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P.J., Dubois F., Hirel B. Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Signal. Behav*. 2013. V. 8. e23329. <https://doi.org/10.4161/psb.23329>
7. Fontaine J.X., Tercé-Laforgue T., Armengaud P., Clément G., Renou J.P., Pelleitier S., Catterou M., Azzopardi M., Gibon Y., Peter J., Lea, Hire B., Dubois F. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism // *Plant Cell*. 2012. V. 24. P. 4044. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103689>
8. Marchi L., Degola F., Polverini E., Tercé-Laforgue T., Dubois F., Hirel B., Restivo F.M. Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is regulated by a combined effect of nitrogen and cytokinin // *Plant Physiol. Biochem*. 2013. V. 73. P. 368. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.019>
9. Baker P.J., Britton K.L., Engel P.C., Farrants G.W., Lilley K.S., Rice D.W. Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase // *Proteins*. 1992. V. 12. P. 75.
10. Marchi L., Degola F., Baruffini E., Restivo F.M. How to easily detect plant NADH-glutamate dehydrogenase (GDH) activity? A simple and reliable in planta procedure suitable for tissues, extracts and heterologous microbial systems // *Plant Sci*. 2021. V. 304. P. 110714. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110714>
11. Nagel M., Hartmann T. Glutamate dehydrogenase from *Medicago sativa* L., purification and comparative kinetic studies of the organ-specific multiple forms // *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1980. V. 35. P. 406. <https://doi.org/10.1515/znc-1980-5-610>
12. Robinson S.A., Stewart G.R., Phillips R. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures // *Plant Physiol*. 1992. V. 98. P. 1190. <https://doi.org/10.1104/pp.98.3.1190>
13. Lehmann T., Ratajczak L. The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating seeds of yellow lupine // *J. Plant Physiol*. 2008. V. 165. P. 149. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.12.010>
14. Sakakibara H., Fujii K., Sugiyama T. Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase // *Plant Cell Physiol*. 1995. V. 36. P. 789. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078823>
15. Lea P.J., Mifflin B.J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement // *Annu. Plant Rev. online*. 2018. P. 1. <https://doi.org/10.1002/9781444328608.ch1>
16. Skopelitis D.S., Paranychianakis N.V., Paschalidis K.A., Pliakonis E.D., Delis I.D., Yakoumakis D.I., Kouvarakis A., Papadakis A.K., Stephanou E.G., Roubelakis-Angelakis K.A. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 2767. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038323>
17. Labboun S., Tercé-Laforgue T., Roscher A., Bedu M., Restivo F.M., Velanis C.N., Skopelitis D.S., Moshou P.N., Roubelakis-Angelakis K.A., Suzuki A., Hirel B. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. In vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments // *Plant Cell Physiol*. 2009. V. 50. P. 1761. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp118>
18. Igamberdiev A.U., Hill R.D. Plant mitochondrial function during anaerobiosis // *Ann. Bot*. 2009. V. 103. P. 259. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn100>
19. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Анохина Г.Б., Гатауллина М.О. Роль эпигенетических механизмов в регуляции активности 2-ОГДГ и МДГ в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при гипоксии // *Физиология растений*. 2021. Т. 68. С. 187. <https://doi.org/10.31857/S0015330321010061>
20. Yang N., Chanda S., Marro S., Ng Y.H., Janas J.A., Haag D., Ang C.E., Tang Y., Flores Q., Mall M., Wapinski O., Li M., Ahlenius H., Rubenstein J.L., Chang H.Y., et al. Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. P. 621.

21. *Sarasketa A., González-Moro M.B., González-Murua C., Marino D.* Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 868.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00029>
22. *Hsieh C.L.* Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 46.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.19.1.46>
23. *Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакбаров Н.Н.* Специфика выделения ДНК из растительных объектов // *Биотехнология. Теория и практика.* 2012. V. 2. P. 9.
24. *Chomczynski P., Sacchi N.* Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156.
25. *Zar J.H.* Biostatistical analysis. Education India: Pearson. 1999. P. 634
26. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. Москва: Высшая школа. 1990. С. 351
27. *Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F.* Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 7457.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21207457>
28. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychina M.A., Igamberdiev A.U.* Expression and promoter methylation of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize under anoxic conditions // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 216. P. 197.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.06.011>
29. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychina M.A., Igamberdiev A.U.* Regulation of expression of the mitochondrial and peroxisomal forms of citrate synthase in maize during germination and in response to light // *Plant Sci.* 2018. V. 272. P. 157.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.017>
30. *Кирнос М.Д., Александровичкина Н.И., Ванюшин Б.Ф.* 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования // *Биохимия.* 1981. V. 46. P. 1458.
31. *Kinnersley A.M., Turano F.J.* Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress // *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2000. V. 19. P. 479.  
<https://doi.org/10.1080/07352680091139277>
32. *Bouche N., Fromm H.* GABA in plants: just a metabolite? // *Trends Plant Sci.* 2004. V. 9. P. 110.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.01.006>
33. *Limami A.M., Glévarec G., Ricoult C., Cliquet J.B., Planchet E.* Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 2325.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern102>
34. *Limami A.M., Diab H., Lothier J.* Nitrogen metabolism in plants under low oxygen stress // *Planta.* 2014. V. 239. P. 531.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-013-2015-9>

## ЛАБОРАТОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИНТЕНСИВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ<sup>1</sup>

© 2023 г. Д. А. Габриелян<sup>а</sup>, М. А. Синетова<sup>а, \*</sup>, А. К. Габриелян<sup>а</sup>, Л. А. Бобровникова<sup>а</sup>,  
В. С. Бедбенов<sup>а</sup>, А. Ю. Стариков<sup>а</sup>, А. А. Зорина<sup>а</sup>, Б. В. Габель<sup>а</sup>, Д. А. Лось<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: maria.sinetova@mail.ru

Поступила в редакцию 25.08.2022 г.

После доработки 07.09.2022 г.

Принята к публикации 07.09.2022 г.

В настоящее время микроводоросли и цианобактерии привлекают к себе внимание исследователей как потенциальные продуценты различных ценных веществ. Для увеличения рентабельности биотехнологических процессов с использованием этих организмов необходим отбор высокоэффективных штаммов и выбор оптимальных условий для их роста и максимальной продуктивности. Оптимизация роста должна производиться, с одной стороны, в интенсивных условиях, максимально близких к масштабному культивированию, а с другой стороны – в небольших объемах, чтобы иметь возможность параллельно проверять множество разных параметров с минимальными затратами. В данной работе мы представляем описание и характеристики сконструированной нами лабораторной системы для интенсивного культивирования (LSIC – Laboratory System for Intensive Cultivation) с термо-, свето- и газорегулированием и возможностью культивирования в 4 повторностях в 8 разных условиях, отличающихся по свету, температуре и концентрации CO<sub>2</sub>. Также в качестве примера представлены результаты ряда экспериментов с использованием установки.

**Ключевые слова:** биомасса, биотехнология, микроводоросли, оптимизация роста, светодиодное освещение, скрининг штаммов, цианобактерии

**DOI:** 10.31857/S0015330322600486, **EDN:** GKCNDL

### ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли и цианобактерии – это простейшие фотосинтезирующие организмы, которые вносят существенный вклад в глобальное поглощение углекислоты и синтез органического вещества с выделением кислорода. В настоящее время эти организмы привлекают к себе внимание исследователей как потенциальные продуценты ценных соединений, таких как полисахариды, липиды с разнообразным составом жирных кислот (ЖК), пигменты, витамины, стерины, антибиотики и токсины [1]. Основным преимуществом микроводорослей и цианобактерий является возможность их выращивания без использования плодородных земель и запасов пресной воды, высокая эффективность фотосинтеза и скорость роста. Однако до сих пор коммерческое получение биомассы и большинства ценных продуктов

остается нерентабельным в промышленных масштабах [2, 3]. Для увеличения рентабельности необходим подбор высокоэффективных штаммов и оптимальных условий для их роста и максимальной продуктивности, включающих такие параметры как температура, освещенность, содержание CO<sub>2</sub> в газовой смеси, состав среды. Оптимизация роста должна производиться, с одной стороны, в интенсивных условиях, максимально близких к масштабному культивированию, а с другой стороны – в небольших объемах, чтобы иметь возможность параллельно проверять множество разных условий с минимальными затратами. Кроме того, микроводоросли и цианобактерии являются модельными объектами для изучения стрессовых ответов фотоавтотрофных организмов на клеточном и молекулярном уровнях [4–6]. Для подбора биотехнологически перспективных штаммов, оптимизации их роста и продуктивности, моделирования промышленного культивирования, а также для изучения стрессовых ответов фототрофных организмов с использованием методов транскриптомики, протеомики и метабомики необходимы лабораторные фотобиореак-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330322600486 для авторизованных пользователей.

**Сокращения:** ГВС – газо-воздушная смесь; ГЛК – гамма-линоленовая кислота; с.м. – сухая масса; LSIC – Laboratory System for Intensive Cultivation.

**Таблица 1.** Характеристики лабораторной установки для интенсивного культивирования

| Характеристика              | Описание  |
|-----------------------------|---|
| Параллелизация              | 8 условий, различных по температуре, освещению, CO <sub>2</sub> , по 4 повторности в каждом варианте  |
| Рабочий объем одного сосуда | 100–250 мл  |
| Температура                 | 22–41°C ± 1°C   |
| Освещение                   | 30–500 мкмоль/(м <sup>2</sup> ·с), теплый белый, красный и голубой свет, возможны другие комбинации по спектру и дополнительное освещение с внешней стороны, контроль с помощью люминометра |
| Оптический путь             | 4 см в цилиндрической части, 8 см в расширении  |
| CO <sub>2</sub>             | 0.04–100%, контроль с помощью газоанализатора   |
| Тип перемешивания           | Барботаж газоздушную смесь  |

торы, позволяющие вести исследования множества образцов в воспроизводимых условиях с заданными параметрами [7, 8].

Основные требования к лабораторной системе интенсивного культивирования:

- перемешивание, обеспечивающее гомогенность культуры по отношению к освещенности и газообмену – необходимое условие для получения автотрофных культур с высокой плотностью;

- поддержание стерильности культуры во время длительных экспериментов;

- поддержание освещенности, температуры и подачи CO<sub>2</sub> в заданном диапазоне, необходимое для интенсификации фотосинтеза, максимального накопления биомассы и обеспечения воспроизводимости экспериментальных условий;

- возможность проводить параллельные эксперименты с разными параметрами культивирования в минимальной повторности (3–4), необходимая для оптимизации условий роста и накопления целевых продуктов в клетках микроводорослей, для изучения стрессовых ответов;

- дешевизна и простота конструкции, что предполагает возможность изготовления из доступных материалов, легкость сборки;

- культивирование в объеме, достаточном для отбора проб на изучение биохимического состава клеток, исследований транскриптомики и протеомики (100–400 мл).

В данной работе мы представляем описание и характеристики сконструированной нами лабораторной системы для интенсивного культивирования (LSIC – Laboratory System for Intensive Cultivation) с термо-, свето- и газорегулированием, возможностью культивирования в 4 повторностях в 8 разных условиях, отличающихся по свету, температуре и концентрации CO<sub>2</sub>. Эта система является обновленной версией установок, разработанных в ИФР РАН в 1960–70-х гг. [9, 10]. Производство подобной установки и ее модификация

под собственные нужды возможны в любых лабораторных условиях из доступных материалов. В качестве примера мы приводим результаты ряда экспериментов, проведенных с использованием установки: 1) скрининг штаммов, пригодных к массовому культивированию; 2) оптимизация ростовых условий; 3) исследование биохимического состава клеток микроводорослей на разных стадиях роста и выбор наиболее продуктивных штаммов.

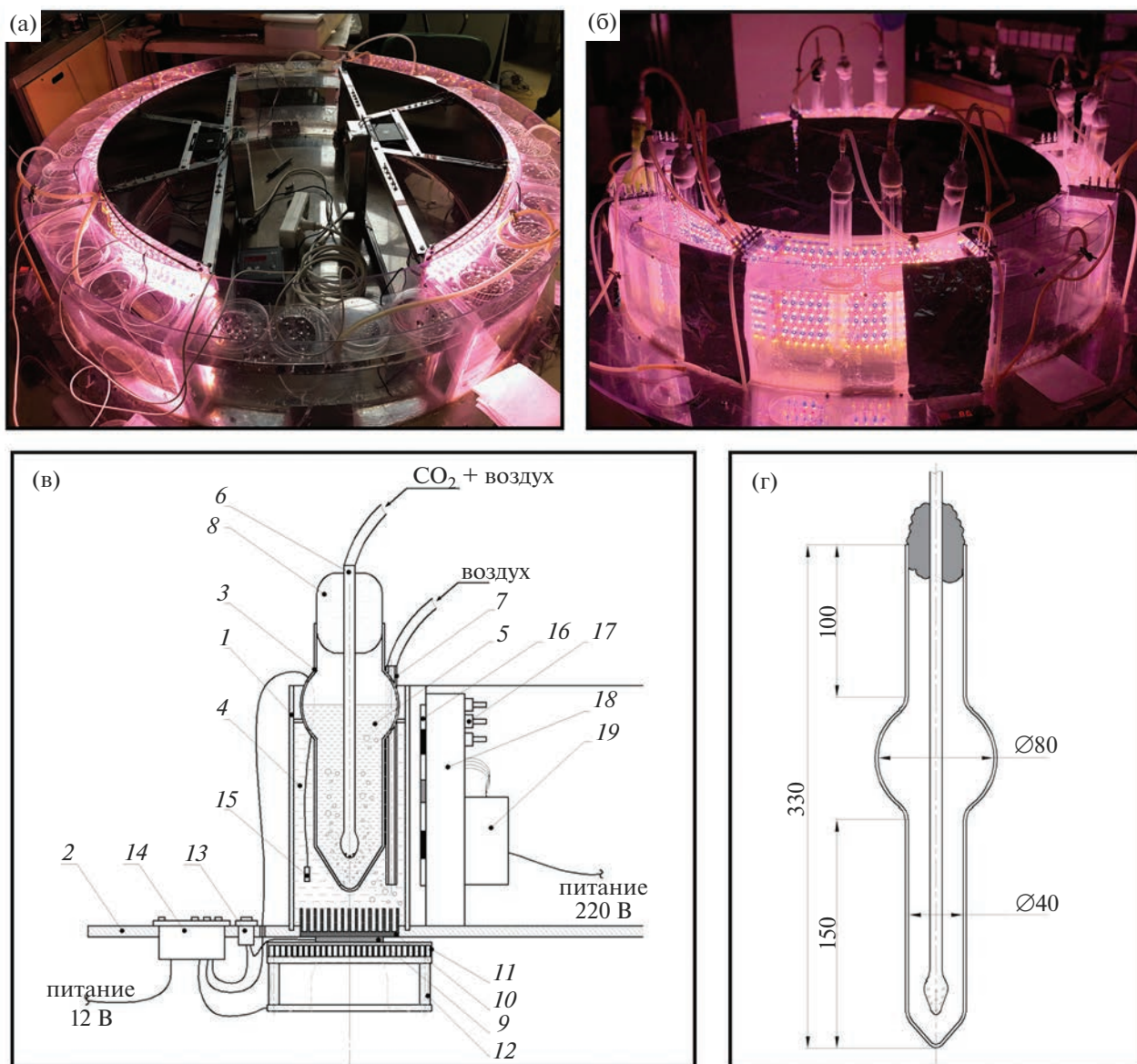
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Лабораторная установка для интенсивного культивирования*

Фотографии, схема и основные характеристики культивационной установки LSIC представлены на рис. 1(а–г) и в табл. 1. Резервуар культивационной установки представляет собой герметичную емкость, объем которой ограничен двумя полыми коаксиальными цилиндрами, расположенными на массивной цилиндрической платформе. Вся конструкция выполнена из монолитного прозрачного поликарбоната. Рабочий объем резервуара разделен на восемь секторов двуслойными стенками с воздушным зазором для обеспечения термоизоляции секторов между собой.

**Система терморегулирования** состоит из восьми термостатирующих модулей, расположенных в середине каждой секции культиватора, и системы подачи воздуха для равномерного перемешивания теплоносителя (воды) в секции культиватора (рис. 1в). Термостатирующий модуль представляет собой систему, состоящую из модуля Пельтье (9), подключенного к измерителю-контроллеру (терморегулятору, 14) через переключатель (13), осевого вентилятора (12) и двух радиаторов (10, 11) (рис. 1в).

Радиаторы служат для интенсификации теплообмена между источником и приемником тепловой энергии. На культивационной установке приме-



**Рис. 1.** Фотографии и схема культивационной установки: а – общий вид установки без сосудов; б – резервуар с сосудами; в – схема рабочей емкости культивационной установки; г – детальная схема сосуда для интенсивного культивирования микроводорослей и цианобактерий. 1 – секция культиватора; 2 – платформа; 3 – сосуд; 4 – теплоноситель (вода); 5 – культура микроводорослей или цианобактерий; 6 – барботер; 7 – трубка подачи воздуха; 8 – ватно-марлевая пробка; 9 – элемент Пельтье; 10 – радиатор №1; 11 – радиатор №2; 12 – вентилятор; 13 – переключатель; 14 – терморегулятор; 15 – датчик температуры; 16 – светодиоды (СД); 17 – выключатели СД; 18 – светодиодный модуль (СДМ); 19 – блок питания СДМ.

няются радиаторы двух типов: профиль  $100 \times 90 \times 26$  мм (10) и профиль  $150 \times 170 \times 20$  мм (11), которые необходимы для передачи тепла от нагревателя (9) к теплоносителю в секции культиватора (4) и для отвода тепла от нагревателя (9) к поверхности радиатора, омываемой воздухом за счет работы осевого вентилятора (12), соответственно. Термостатирующий модуль позволяет задавать температуру теплоносителя в рабочей емкости с точностью в пределах двух градусов по Фаренгей-

ту: границы температур устанавливаются исходя из отклонения от рабочей температуры на один градус по Фаренгейту. Терморегулятор (14) управляет переключением режимов нагрев–охлаждение при температурах в емкости ниже или, соответственно, выше  $1^\circ\text{F}$  от рабочей и отключением питания элемента Пельтье (9) при рабочих значениях температуры. Предусмотрено ручное переключение режимов и отключение работы элемента Пельтье с помощью трехпозиционного переключателя.

чателя (13). В каждом термостатирующем модуле установлено по одному элементу Пельтье марки TEC1-12712 размерами  $62 \times 62 \times 4$  мм и мощностью 120 Вт с рабочим напряжением 12 В.

**Система освещения** позволяет проводить исследования по влиянию условий культивирования в большом диапазоне значений по интенсивности (от 30 до 500 мкмоль/м<sup>2</sup> · с) в разных по спектральному составу вариантах освещенности (белые светодиоды дополнены синими и красными). Предусмотрена возможность установки дополнительного внешнего освещения, к примеру, для определения пороговых значений интенсивности света исследуемой культуры.

Восьми секторам резервуара культивационной установки соответствуют свои секции системы освещения. Секции сгруппированы в модули следующим образом: два модуля по три секции и два односекционных модуля. Модули питаются отдельно друг от друга. Такое разбиение позволяет проводить обслуживание и смену модулей освещения, не нарушая работы всего реактора.

Каждая секция модуля представляет собой спаянные в определенной последовательности светодиодные ленты различного свечения (белые 2400К марки SDM 2835, красные с 620–630 нм и синие 465–475 нм, марки SDM 3528 от компании “Arlight”, Беларусь), размещенные на дуговых конструкциях из листового алюминия радиусом меньшим, чем внутренний радиус стенки биореактора. Таким образом, светогенерирующая поверхность модулей расположена в непосредственной близости к светопринимающей поверхности реактора, на расстоянии не более 3 см, что позволяет сократить потери энергии света и равномерно распределить освещение по емкостям реактора.

На секцию приходится 13 светодиодных лент белого теплого света и по 6 лент красного и синего. Для двух емкостей дополнительно собраны односекционные модули только из лент красного и синего света для исследования влияния на рост света с длинами волн 620–630 нм и 465–475 нм и их различных комбинаций.

**Подача и регулирование газо-воздушной смеси.** Чистый диоксид углерода из баллона подается через ротаметр в смесительную емкость, где смешивается с воздухом, нагнетаемым компрессором, далее смесь через ротаметры подачи и измерения концентрации CO<sub>2</sub> поступают через фильтр и стеклянный барботер в сосуд с суспензией микроводорослей или цианобактерий. Расход смеси регулируется краниками и зажимами на подводящих силиконовых трубках.

**Сосуд для интенсивного культивирования.** Форма сосуда была разработана еще для первых вариантов установки [9] и позже модифицирована (рис. 1г). Сосуд представляет собой по сути модифицированную барботажную колонну (bubble

column) и позволяет производить выращивание культуры в диапазоне объемов 100–250 мл. Важной особенностью сосуда является отсутствие углов, положение барботера и форма дна, что позволяет обеспечить равномерное перемешивание и оптимизировать газообмен. Нижняя часть сосуда имеет оптический путь 4 см, позволяющий обеспечить оптимальную освещенность культуры. Расширенная часть сосуда выполняет функции пеноотбойника, обеспечивает оседание пены, так же как и верхняя вытянутая часть, и создает дополнительный объем. Сосуд, закрытый ватно-марлевой пробкой, можно стерилизовать при температуре 150°C и поддерживать в нем стерильные условия при культивировании, пропуская воздушную смесь для барботажа через ватный или целлюлозный фильтр (Millex-GS, 0.22 μm, “Merck Millipore”, США).

#### *Измерение облученности*

Все измерения уровня облученности в рабочем объеме фотобиореакторов и на поверхности светодиодных модулей снимались прибором LI-COR (Model LI-189 с LI-190SA “Quantum Sensor”, США) в мкмоль/(м<sup>2</sup> · с).

#### *Оценка скорости перемешивания*

Для оценки скорости и полноты перемешивания измеряли время, за которое 1 мл 0.1% водного раствора красителя Ponceau полностью растворится в 250 мл воды при обычно используемой интенсивности барботажа [11]. Измерения повторяли 5 раз.

#### *Оценка температурного контроля, теплопереноса*

Оценивали, за какое время после изменения температурного режима изменится температура в трех сосудах с 150 мл воды или культуры микроводорослей (при таком объеме заполненная часть сосуда полностью погружена в теплоноситель), оценивали соответствие температуры в сосуде и в водяной бане и точность поддержания температуры на протяжении суток.

#### *Тест на стерильность*

Для тестирования возможности поддержания асептических условий культивирования в сосуд в стерильных условиях добавляли среду LB с 2% глюкозы и помещали его в условия интенсивного культивирования при температуре 32°C на 7 дней. Затем пробу отбирали и высевали на агаризованную среду LB с глюкозой. После инкубации в течение 14 дней при 30°C тестовые чашки были проверены на наличие колоний.

Аксеничность культуры *C. sorokiniana* IPPAS C-1, выращиваемой на культивационной установке в

**Таблица 2.** Штаммы и условия культивирования

| Штамм   | Среда для культивирования* | Температура культивирования |
|---|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Limnospira</i> sp. IPPAS B-256             | Заррука                    | 32°C                        |
| <i>Limnospira</i> sp. IPPAS B-287             | Заррука                    | 32°C                        |
| <i>Limnospira</i> sp. IPPAS B-1526            | Заррука                    | 32°C                        |
| <i>Cyanobacterium</i> sp. IPPAS B-1528        | Заррука                    | 32°C                        |
| <i>Geminocystis</i> sp. IPPAS B-1530          | Заррука                    | 27°C                        |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> IPPAS B-1527    | Microcystis                | 27°C                        |
| <i>Nodularia spumigena</i> IPPAS B-1529       | Заррука-N                  | 32°C                        |
| <i>Chromochloris zofingiensis</i> IPPAS C-30  | 5A+2B                      | 27°C                        |
| <i>Chromochloris zofingiensis</i> IPPAS C-108 | 5A+2B                      | 27°C                        |
| <i>Chlorella</i> sp. IPPAS C-1210             | BVM-3N                     | 30°C                        |
| <i>Chlorella sorokiniana</i> IPPAS C-1        | 1/2 Тамия модифицированная | 32°C                        |
| <i>Lobosphaeropsis lobophora</i> IPPAS C-102  | BVM-3N                     | 27°C                        |
| <i>Chlamydomodium</i> sp. IPPAS C-1503        | BVM-3N                     | 27°C                        |

Примечание: \* Состав сред указан в [http://cellreg.org/Catalog\\_2020/media\\_list.html](http://cellreg.org/Catalog_2020/media_list.html)

течение трех суток, проверяли микроскопированием (микроскоп Axio Imager D1; “Carl Zeiss”, Германия) и посадкой на чашку Петри с тестовой средой (BVM-3N с добавлением 0.2% глюкозы и 0.02% казеинового гидролизата). Тестовую чашку инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 7 дней, затем проверяли на присутствие посторонних колоний.

#### Штаммы цианобактерий и микроводорослей

В работе были использованы 13 штаммов цианобактерий и микроводорослей из коллекции IPPAS ИФР РАН (табл. 2).

#### Условия интенсивного культивирования

Исходные культуры штаммов микроводорослей и цианобактерий поддерживали на соответствующих агаризованных средах в пробирках или чашках Петри. Перед экспериментом штаммы пересаживали в 100–150 мл жидкой среды в колбу Эрленмейера и подрощивали на качалке при освещении 50 мкмоль /м<sup>2</sup> · сек в течение 7–14 дней. Интенсивное культивирование производили в вышеописанной культивационной установке, в сосудах с 150–250 мл соответствующей среды при освещении 500 мкмоль /м<sup>2</sup> · сек и оптимальной температуре роста, если не указано иное. Перемешивание и аэрация культуры осуществлялись за счет барботирования стерильной газовоздушной смесью. Объемный расход подаваемой смеси составлял около 0.25 л/мин, концентрация CO<sub>2</sub> поддерживалась в диапазоне 1.2–1.8% (v/v). Для адаптации

к условиям интенсивного культивирования каждую культуру предварительно выращивали до экспоненциальной фазы в указанных условиях, затем разбавляли свежей средой до оптической плотности, измеренной при 750 нм (ОП<sub>750</sub>) 0.1–0.3 и проводили эксперименты в трех повторностях. Среды культивирования и оптимальные температуры роста указаны в таблице 2.

#### Ростовые характеристики

Скорость роста оценивалась по изменению ОП<sub>750</sub> суспензии и по сухой массе. ОП<sub>750</sub> измеряли на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (“Thermo Scientific”, США).

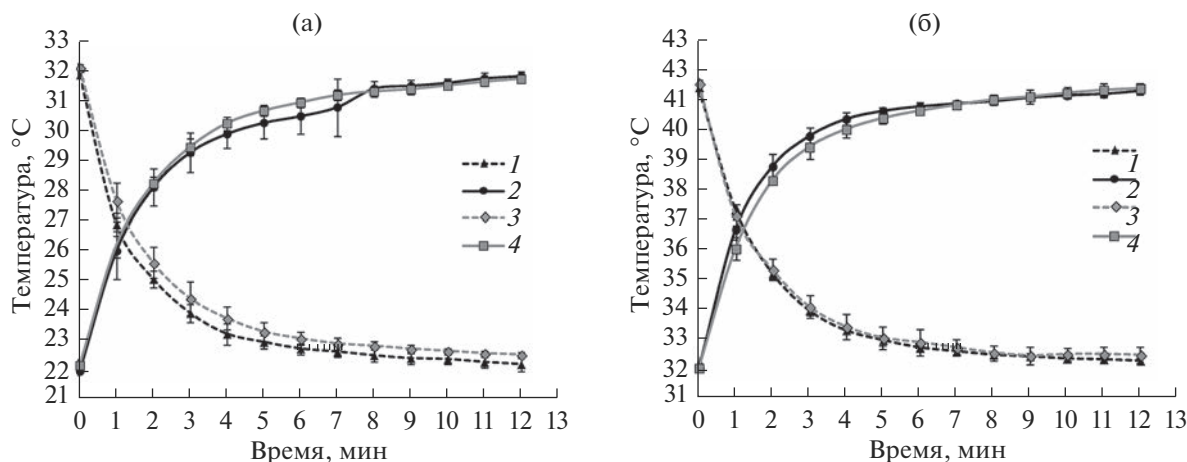
Для измерения сухой массы 1–10 мл культуры осаждали центрифугированием, промывали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу 24 ч при 80°C в предварительно взвешенных микропробирках.

Для оценки скорости роста использовали следующие параметры.

Удельная скорость роста,  $\mu$ , оценивалась по изменению оптической плотности культуры или по сухой массе (/сут.):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}{t_2 - t_1}, \quad (1)$$

где  $N_1$  и  $N_2$  – ОП<sub>750</sub>, измеренная во время 1 ( $t_1$ ) и время 2 ( $t_2$ ) соответственно.



**Рис. 2.** Динамика изменения температуры в сосудах при перемещении из секции с установленной температурой 32°C в секцию с температурой 22°C и обратно (а); в секцию с температурой 42°C и обратно (б). 1, 2 – сосуды с водой; 3, 4 – сосуды с плотной суспензией микроводорослей. 1, 3 – охлаждение; 2, 4 – нагрев. Показаны средние значения и стандартные отклонения по трем повторностям.

Средняя скорость накопления биомассы,  $v_{\text{ср}}$ , оценивалась по сухой массе (г/(л · сут.)):

$$v_{\text{ср}} = \frac{m_2 - m_1}{t_2 - t_1}, \quad (2)$$

где  $m_1$  и  $m_2$  – сухая масса 1 мл культуры, измеренная во время 1 ( $t_1$ ) и время 2 ( $t_2$ ).

По удельной скорости также рассчитывалось время удвоения биомассы  $T_{\text{удв}}$ :

$$T_{\text{удв}} = \frac{\ln(2)}{\mu}. \quad (3)$$

Конечную продуктивность  $P_k$  штаммов определяли по концентрации биомассы в конце культивирования.

Эксперименты по оценке скорости роста проводили в трех повторностях.

### Биохимический анализ

Методы биохимического анализа клеток микроводорослей и цианобактерий подробно описаны в [12]. Концентрации хлорофиллов и каротиноидов определяли спектрофотометрически в метанольных экстрактах. Содержание белка в клетках определяли с бидинхониновым реагентом (BCA1, “Sigma-Aldrich”, США), согласно инструкции производителя. Содержание запасных углеводов определяли фенол-серникоислым методом. Содержание суммарных липидов оценивали газохроматографически в пересчете на количество этерифицированных ЖК на грамм сухой массы клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Оценка скорости перемешивания

При стандартной интенсивности барботаж 1 мл 0.1% водного раствора Ронсеау растворялся в сосуде с 250 мл воды за 4–5 с. По распределению красителя было видно, что зоны без перемешивания в сосуде отсутствуют. В отсутствие барботажа краситель полностью растворялся за 45 с.

### Температурный тест

Во всех экспериментах при переносе сосудов с 150 мл воды или с 150 мл плотной суспензии клеток в секцию с температурой, отличающейся на 10°C (были установлены значения температуры 22, 32 и 42°C), температура в сосудах достигала заданных значений за 12 мин, при этом уже за 6–8 мин температура достигала значений, отличных от заданного на 1°C (рис. 2).

При температуре окружающей среды 23°C и максимальном освещении заданные в секциях установки значения температуры 22, 32 и 44°C поддерживались в течение суток в пределах 22–23°C, 31–33°C, 41–41.5°C соответственно.

### Тест на стерильность

Возможность сохранять культуры аксеничными при длительном культивировании в установке проверяли двумя способами. В первом варианте в установке инкубировали сосуды с органической средой LB с добавлением глюкозы при 32°C и стандартных условиях барботажа в течение 7 дней. Отсутствие роста микроорганизмов было подтверждено отсутствием изменения оптической плотности, измеренной при 595 нм, и отсутстви-



**Таблица 3.** Конечная продуктивность штаммов

| Штамм   | П <sub>к</sub> , г/л |
|---|----------------------|
| <i>Microcystis aeruginosa</i><br>IPPAS B-1527   | 1.5 ± 0.2            |
| <i>Cyanobacterium</i> sp.<br>IPPAS B-1528       | 4.7 ± 0.2            |
| <i>Geminocystis</i> sp.<br>IPPAS B-1530         | 1.0 ± 0.0            |
| <i>Nodularia spumigena</i><br>IPPAS B-1529      | 4.3 ± 0.4            |
| <i>Lobosphaeropsis lobophora</i><br>IPPAS C-102 | 3.8 ± 0.1            |
| <i>Chlamydomodium</i> sp.<br>IPPAS C-1503       | 1.9 ± 0.1            |

ем колоний после посева среды из сосудов на агаризованную среду LB с глюкозой после 35 дней инкубации (Дополнительные материалы, рис. 1а). Во втором варианте на установке выращивали аксеничную культуру *C. sorokiniana* IPPAS C-1 в течение 3 суток. Аксеничность культуры *C. sorokiniana* IPPAS C-1 после культивирования подтверждали микроскопированием и инкубацией в темноте на тестовой среде. Микроскопирование показало отсутствие посторонних организмов. Проверка культуры на тестовой среде (Дополнительные материалы, рис. 1б) также подтвердила отсутствие в культуре посторонних организмов – после инкубации в темноте на чашках был замечен только зеленый газон *C. sorokiniana* IPPAS C-1, способной к гетеротрофному росту, а колонии бактерий или грибов отсутствовали.

#### Скрининг штаммов, пригодных к массовому культивированию

Для данного этапа были отобраны 6 штаммов цианобактерий и зеленых микроводорослей коллекции IPPAS, ранее не культивировавшиеся в интенсивных условиях: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1528, *Geminocystis* sp. IPPAS B-1530, *Microcystis aeruginosa* IPPAS B-1527, *Nodularia spumigena* IPPAS B-1529, *Lobosphaeropsis lobophora* IPPAS C-102, *Chlamydomodium* sp. IPPAS C-1503. Для всех штаммов с использованием культивационной установки были получены интенсивные культуры и данные по конечной продуктивности после 7 суток культивирования (табл. 3).

#### Оптимизация ростовых условий

##### Определение температурного оптимума штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1

Для выявления температурных зависимостей роста *C. sorokiniana* IPPAS C-1 рабочие температуры в четырех емкостях культивационной установки были выставлены на 26, 31, 36 и 41°C.

Результаты проведенных исследований (рис. 3) показывают, что в первые сутки самые высокие значения максимальной удельной скорости  $\mu_{\max}$  были у вариантов, выращиваемых при 31 и 36°C (минимальное время удвоения составляло 5.3 ч и 4.6 ч, соответственно). Показатель  $\mu_{\max}$  характеризует максимально возможную скорость роста штамма в экспоненциальной фазе роста, когда отсутствует лимитирование роста освещенностью и компонентами среды.

Однако, по окончании всего периода культивирования (на седьмые сутки) больше биомассы накопили варианты, выращиваемые при 26 и 31°C. Рост вариантов, выращиваемых при 41°C, был полностью ингибирован уже после 72 ч, но гибели культуры не произошло даже после 7 сут., так как последующее снижение температуры до 31°C привело к возобновлению роста культуры.

#### Влияние условий низкой и высокой освещенности на накопление биомассы у штамма *Chlorella* sp. IPPAS C-1210

Сравнивали рост культуры *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 при интенсивностях освещения 100 и 500 мкмоль/(м<sup>2</sup> · с) (рис. 4). Варианты существенно отличались по  $\mu_{\max}$ , которая была в 2 раза выше в варианте с большей освещенностью (минимальное время удвоения составило 12.1 ч и 5.5 ч, соответственно). За счет этого различия в варианте с большей освещенностью была достигнута также значительно более высокая конечная оптическая плотность культуры.

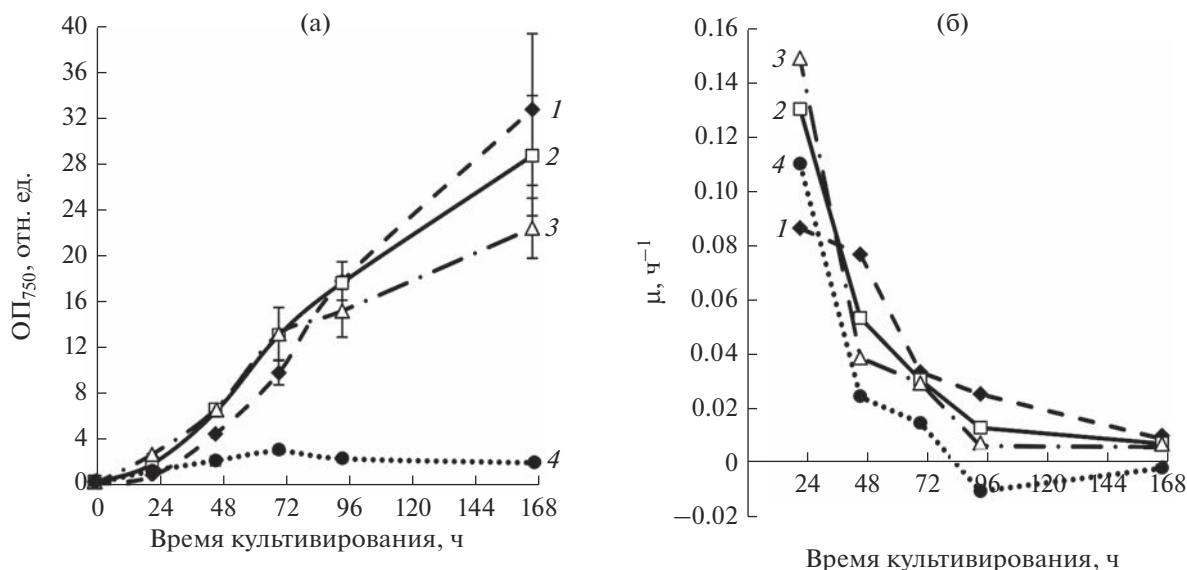
#### Исследования биохимического состава штаммов микроводорослей и цианобактерий на разных стадиях роста и выбора наиболее продуктивных штаммов

##### Сравнение штаммов рода *Limnospira*

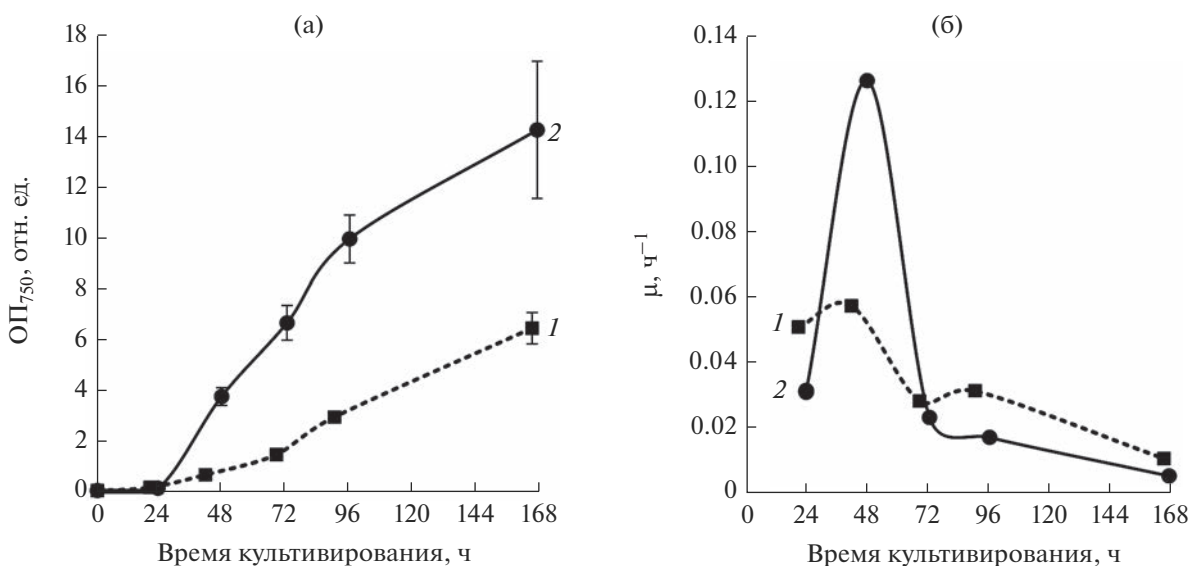
Сравнивали ростовые характеристики и биохимический состав трех штаммов нитчатых цианобактерий IPPAS B-256, IPPAS B-287, и IPPAS B-1526, принадлежащих к роду *Limnospira* sp. (ранее относимых к роду *Arthrospira* [13]).

Штаммы, относящиеся к этому роду, являются источником макро- и микроэлементов, витаминов, пигментов, белков, полисахаридов,  $\gamma$ -линоленовой кислоты (ГЛК) и других биоактивных соединений [14]. Поэтому особое внимание при сравнении штаммов уделяли скорости накопления биомассы, содержанию белков, гликогена и ГЛК.

Все исследуемые штаммы отличались высокими скоростями роста (минимальные времена удвоения 8–14 ч, средняя скорость накопления биомассы 0.91–1.24 г/(л · сут.). Штамм IPPAS B-256 отличался высоким значением  $v_{cp}$  и самой высо-



**Рис. 3.** Зависимость роста *C. sorokiniana* IPPAS C-1 от температуры при подаче ГВС с концентрацией CO<sub>2</sub> 1.5–1.8% и постоянном освещении 500 мкмоль/(м<sup>2</sup> · с). Ростовые кривые – (а); удельная скорость роста – (б) 1 – 26°C; 2 – 31 °С; 3 – 36°C; 4 – 41°C. Показаны средние значения и стандартные отклонения по трем повторностям.



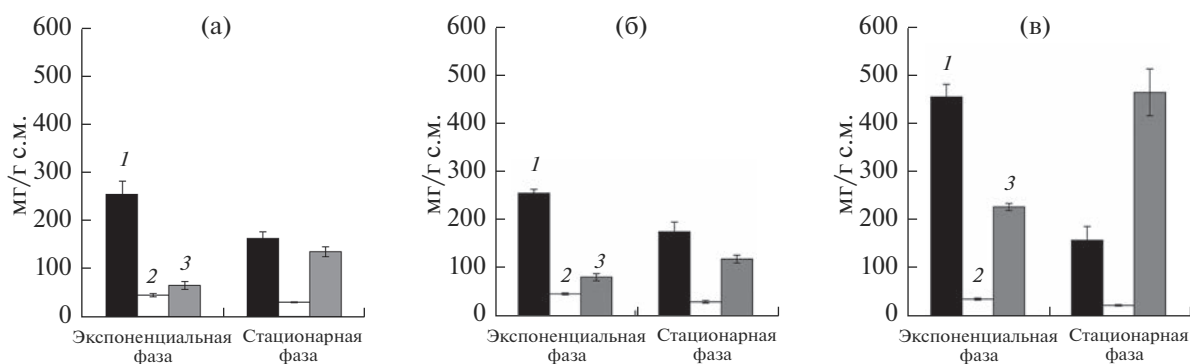
**Рис. 4.** Зависимость роста *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 от интенсивности освещения при температуре 30°C и подаче ГВС с концентрацией CO<sub>2</sub> 1.5–1.8%. Ростовые кривые – (а); удельная скорость роста – (б). 1 – 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> · с); 2 – 500 мкмоль/(м<sup>2</sup> · с). Показаны средние значения и стандартные отклонения по трем повторностям.

кой конечной продуктивностью после 10 дней культивирования (табл. 4). Штамм IPPAS B-287 характеризовался высоким значением  $\mu_{max}$ , высоким содержанием ГЛК в общих ЖК (18%) и в культуре (табл. 4). Штамм IPPAS B-1526 имел высокие значения  $\mu_{max}$ ,  $\nu_{cp}$ , конечной продуктивности и содержания ГЛК в общих ЖК (20%) и в культуре (табл. 4). Кроме того, этот штамм имел самое высокое содержание белка в экспоненциальной фазе и самое высокое содержание глико-

гена в стационарной фазе (рис. 5), однако он более всех исследованных штаммов был склонен образовывать крупные плотные конгломераты, не поддававшиеся гомогенизации.

#### Сравнение штаммов *Chromochloris zofingiensis*

Сравнивали ростовые характеристики и биохимический состав двух штаммов *C. zofingiensis* IPPAS C-30 и IPPAS C-108, которые являются



**Рис. 5.** Содержание белков (1), липидов (2) и запасных углеводов (3) на разных стадиях роста у штаммов *Limnospira* sp. IPPAS B-256 (а), IPPAS B-287 (б) и IPPAS B-1526 (в). Показаны средние значения и стандартные отклонения по трем повторностям.

**Рис. 6.** Ростовые характеристики и биохимический состав клеток штаммов *C. zofingiensis* IPPAS C-30 (а, в, д) и IPPAS C-108 (б, г, е). Кривые роста (1) и удельные скорости роста (2) – а, б; содержание хлорофиллов *a* (1), *b* (2) и каротиноидов (3) на разных стадиях роста – в, г; содержание белков (1), липидов (2), запасных углеводов (3) на разных стадиях роста – д, е. Показаны средние значения и стандартные отклонения по трем повторностям.

сестринскими штаммами для типового штамма данного вида SAG 211-14 [15]. Штаммы *C. zofingiensis* представляют интерес для биотехнологии, так как способны к вторичному каротиногенезу и могут синтезировать астаксантин, а также накапливают значительное количество липидов [16]. Изучаемые штаммы поступили в коллекцию IPPAS из коллекции Прата в 1964 г. и из коллекции LABIK лаборатории альгологии Ботанического института имени В. Л. Комарова в 1989 г., соответственно. До 2020 г. штаммы поддерживались на разных средах: IPPAS C-30 на среде Тамия, IPPAS C-108 – на среде ВВМ-3N. Целью данного эксперимента было проверить, насколько сохранилось сходство между этими сестринскими штаммами по ростовым характеристикам и по биохимическому составу.

При выращивании в одинаковых интенсивных условиях штаммы показали сходные ростовые характеристики (рис. 6а, б). Оба штамма характеризовались наличием лаг-фазы длиной около суток, минимальное время удвоения составляло 12.3 ч и 13.4 ч, конечная продуктивность составила  $2.85 \pm 0.09$  г/л и  $2.58 \pm 0.08$  г/л у IPPAS C-30 и IPPAS C-108, соответственно.

В обоих исследуемых штаммах при переходе к стационарной фазе содержание хлорофилла падало, тогда как содержание каротиноидов возрастало (рис. 6в, г), что свидетельствует о вторичном каротиногенезе в клетках исследуемых штаммов.

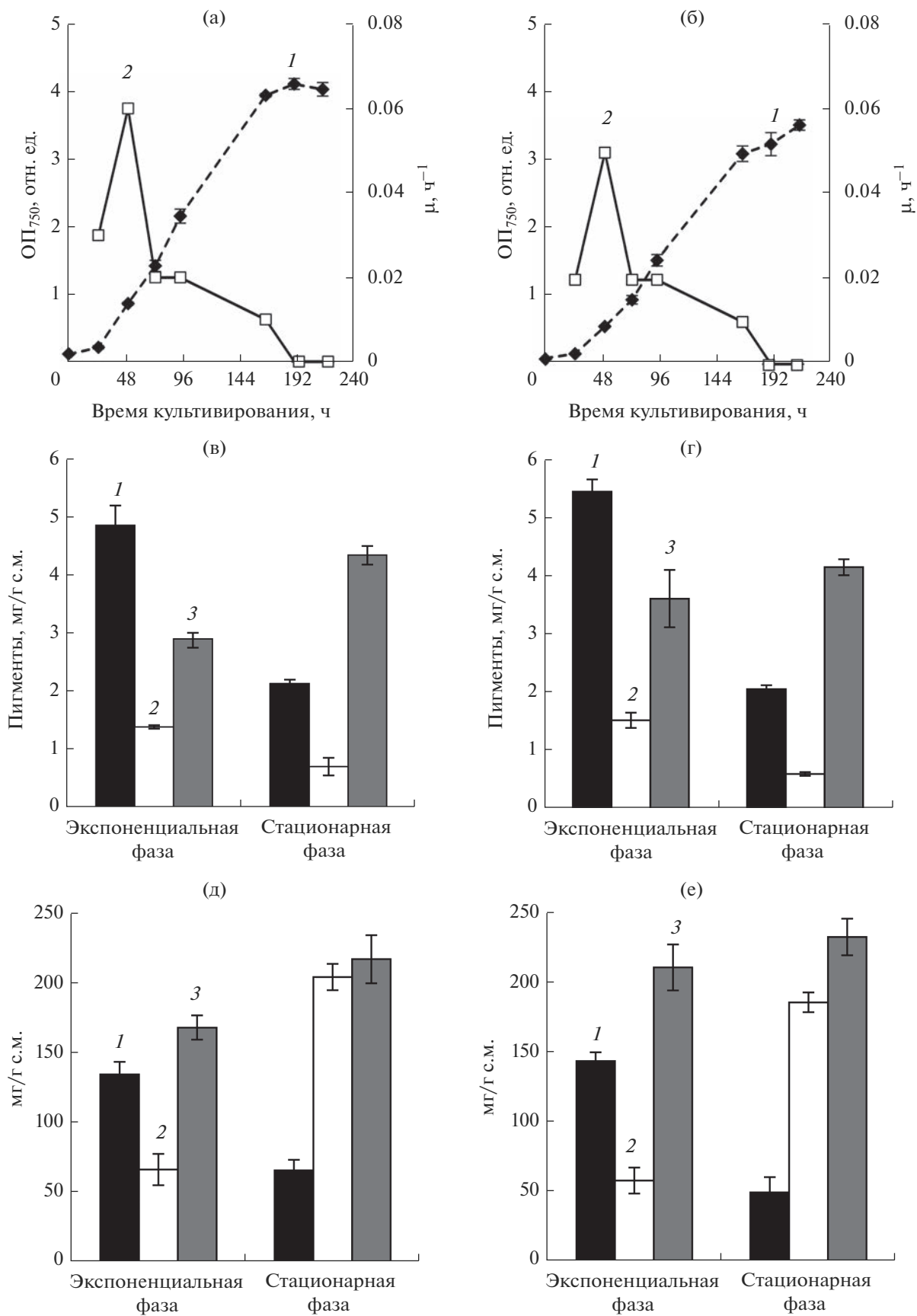
Динамика содержания общего белка, запасных углеводов и суммарных липидов в клетках исследуемых штаммов также была сходна: при переходе из экспоненциальной в стационарную фазу в клетках обоих штаммов снижалось содержание белка и возрастало содержание липидов и крахмала (рис. 6д, е).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Тестирование разработанной нами лабораторной системы интенсивного культивирования показало, что осуществляющиеся в ней перемешивание с помощью барботирования газовой смеси в сосудах особой формы обеспечивает гомогенность культуры. Система терморегуляции позволяет поддерживать температуру в диапазоне 22–42°C с точностью до 1°C. При этом содержимое сосуда достигает установленной в культивационной сек-

**Таблица 4.** Ростовые характеристики и продуктивность штаммов *Limnospira*

| Штамм                              | $\mu_{max}$ , /сут. | $T_{удв}$ , ч | $v_{ср}$ , Г/(л · сут) | $P_k$ , г/л   | ГЛК, мг/л |
|------------------------------------|---------------------|---------------|------------------------|---------------|-----------|
| <i>Limnospira</i> sp. IPPAS B-256  | 1.20                | 13.9          | 1.21                   | $9.5 \pm 0.1$ | 25        |
| <i>Limnospira</i> sp. IPPAS B-287  | 1.73                | 9.6           | 0.91                   | $8.8 \pm 0.2$ | 53        |
| <i>Limnospira</i> sp. IPPAS B-1526 | 2.12                | 7.8           | 1.24                   | $9.2 \pm 0.2$ | 40        |



ции температуры в течение максимум 12 мин при условии, что изначальная разница в температуре между жидкостью в сосуде и теплоносителем составляет 10°C. Вместе с тем, температура, отличная от установленной на 1°C, была достигнута уже в течение 6–8 мин. Таким образом, данная установка позволит проводить эксперименты по исследованию механизмов регуляции экспрессии генов при воздействии холодового или теплового стрессов и брать первые пробы уже через 15 мин. Тест на поддержание стерильности показал, что в установке возможно длительное культивирование (в течение 3–7 суток) в асептических условиях.

С использованием данной установки нами была проверена возможность интенсивного культивирования ряда штаммов, недавно изолированных из природных местообитаний. Среди исследуемых штаммов были цианобактерии и зеленые микроводоросли, нитчатые, колониальные и одноклеточные организмы. Всех их оказалось возможным выращивать в представленной системе культивирования. По конечной продуктивности для дальнейших исследований были отобраны штаммы с наиболее высокими показателями: *Syano bacterium* sp. IPPAS B-1528 и *Nodularia spumigena* IPPAS B-1529, изолированные из содовых озер.

Результаты экспериментов с поиском оптимальной температуры роста для штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1 показали, что штамм способен накапливать биомассу с высокой скоростью в широком диапазоне температур 26–36°C при аэрировании ГВС с 1.5–1.8% CO<sub>2</sub> и при постоянном освещении с интенсивностью 500 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с). Следует отметить, что первые трое суток культивирования набор биомассы шел интенсивней при 31 и 36°C, чем при 26°C, однако, по окончании всего периода культивирования (на седьмой день) накапливали больше биомассы варианты, выращенные при 26°C. Культура, выращиваемая в течение 7 сут. при температуре 41°C, находилась в неблагоприятных для роста условиях, однако не потеряла жизнеспособность.

Сравнение накопления биомассы штаммом *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 в условиях высокой и низкой освещенности показало, что высокая освещенность (500 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с)) позволяет увеличить скорость роста и концентрацию биомассы более чем в 2 раза.

Выращивание трех штаммов *Limnospira* на представленной установке позволило получить культуры с высокой продуктивностью по биомассе и провести сравнение биохимического состава исследуемых штаммов на разных стадиях роста. Высокое содержание белка, близкое к среднему у этого рода, имел только штамм IPPAS B-1526: 45.9 ± ± 2.7% по сравнению с 45% в среднем [14]. Остальные два штамма значительно отставали по этому параметру. По содержанию липидов все штаммы были в пределах известных средних зна-

чений 1.5–12% [14]. По содержанию гликогена штаммы IPPAS B-256 и IPPAS B-287 находились в пределах известных средних значений 10–15% для общего содержания углеводов [14]. Содержание гликогена в клетках IPPAS B-1526 было значительно выше и достигало 46.9 ± 4.9% в стационарной фазе. Все исследуемые штаммы имели более низкую долю ГЛК по сравнению со средними известными значениями 40% [14], однако за счет высокой продуктивности по биомассе содержание ГЛК в культуре штаммов IPPAS B-1526 и IPPAS B-287 достигало значений, превышающих полученные в других экспериментах [17, 18].

Так как на разработанной нами установке возможно полное воспроизведение заданных условий по свету, температуре и обеспеченностью углекислотой в разных секциях, то было возможно провести сравнение в минимально необходимых трех повторностях двух сестринских штаммов *C. zoefingiensis*, полученных в коллекции IPPAS из разных мест в разное время и поддерживаемых на протяжении десятилетий на разных средах. Сравнение ростовых кривых и биохимического состава показало отсутствие значительных различий между штаммами. Оба штамма оказались способными к вторичному каротиногенезу и накоплению липидов, т.е. две основные биотехнологически ценные характеристики *C. zoefingiensis* [16] были сохранены в обоих штаммах.

Таким образом, представленная нами лабораторная система имеет простое исполнение и собрана из доступных материалов (см. раздел 2.1), поэтому воспроизведение ее аналогов возможно практически в любой лаборатории. Лабораторная установка имеет широкий спектр применения, примеры которого приведены в данной работе.

Работа выполнена на базе “Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей” при финансовой поддержке Меггранта Правительства Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2019-1882 (эксперименты с микроводорослями и цианобактериями), а также в рамках выполнения темы № 122042600086-7 государственного задания Министерства науки и высшего образования России (температурные тесты, тесты на стерильность и перемешивание).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae // J. Biosci.

- Bioeng. 2006. V. 101. P. 87.  
<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
2. *Chisti Y.* Raceways-based production of algal crude oil // *Green*. 2013. V. 3. P. 195.  
<https://doi.org/10.1515/green-2013-0018>
  3. *Hoang A.T., Sirohi R., Pandey A., Nižetić S., Lam S.S., Chen W.-H., Luque R., Thomas S., Arici M., Pham V.V.* Biofuel production from microalgae: challenges and chances // *Phytochem. Rev.* 2022.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-022-09819-y>
  4. *Zorina A.A., Bedbenov V.S., Novikova G.V., Panichkin V.B., Los D.A.* Involvement of serine/threonine protein kinases in the cold stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Functional characterization of SpkE protein kinase // *Mol. Biol.* 2014. V. 48(3). P. 390.  
<https://doi.org/10.1134/S0026893314030212>
  5. *Sinetova M.A., Los D.A.* Systemic analysis of stress transcriptomics of *Synechocystis* reveals common stress genes and their universal triggers // *Mol. BioSyst.* 2016. V. 12. P. 3254.  
<https://doi.org/10.1039/C6MB00551A>
  6. *Mironov K.S., Sinetova M.A., Shumskaya M., Los D.A.* Universal molecular triggers of stress responses in cyanobacterium *Synechocystis* // *Life*. 2019. V. 9. P. 67.  
<https://doi.org/10.3390/life9030067>
  7. *Tsygankov A.A.* Laboratory scale photobioreactors. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2001. V. 37(4). P. 333.  
<https://doi.org/10.1023/A:1010266116747>
  8. *Benner P., Meier L., Pfeffer A., Kruger K., Oropeza Vargas J.E., Weuster-Botz D.* Lab-scale photobioreactor systems: principles, applications, and scalability // *Bio-process Biosyst. Eng.* 2022. V. 45. P. 791.  
<https://doi.org/10.1007/s00449-022-02711-1>
  9. *Владимирова М.Г., Семененко В.Е.* Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М.: Академия наук СССР, 1962. 58 с.
  10. *Абдуллаев А.А., Семененко В.Е.* Интенсивная культура *Dunaliella salina* Теод. и некоторые ее физиологические характеристики // *Физиология растений*. 1974. Т. 21. P. 1145.
  11. *Fuchs T., Arnold N.D., Garbe D., Deimel S., Lorenzen J., Masri M., Mehlmer N., Weuster-Botz D., Bruck T.B.* A newly designed automatically controlled, sterilizable flat panel photobioreactor for axenic algae culture // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. P. 697354.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.697354>
  12. *Sinetova M.A., Sidorov R.A., Starikov A.Y., Voronkov A.S., Medvedeva A.S., Krivova Z.V., Pakholkova M.S., Bachin D.V., Bedbenov V.S., Gabrielyan D.A., Zayadan B.K., Bolatkhan K., Los D.A.* Assessment of biotechnological potential of cyanobacteria and microalgae strains from the IPPAS culture collection // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. P. 36.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683820070030>
  13. *Nowicka-Krawczyk P., Mühlsteinová R., Hauer T.* Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria) // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 694.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36831-0>
  14. *Furmaniak M.A., Misztak A.E., Franczuk M.D., Wilmotte A., Waleron M., Waleron K.F.* Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 2541.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02541>
  15. *Fučíková K., Lewis L.* Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: Resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta) // *Fottea*. 2012. V. 12. P. 83.  
<https://doi.org/10.5507/fof.2012.007>
  16. *Liu J., Sun Z., Gerken H., Liu Z., Jiang Y., Chen F.* *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential // *Mar. Drugs*. 2014. V. 12. P. 3487.  
<https://doi.org/10.3390/md12063487>
  17. *Mahajan G., Kamat M.*  $\gamma$ -Linolenic acid production from *Spirulina platensis* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. V. 43. P. 466.  
<https://doi.org/10.1007/bf00218450>
  18. *Golmakani M.T., Rezaei K., Mazidi S., Razavi S.H.*  $\gamma$ -Linolenic acid production by *Arthrospira platensis* using different carbon sources // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2012. V. 114. P. 306.  
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201100264>

## БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КЛЕТОК *Euglena gracilis* ПРИ МИКСОТРОФНОМ РОСТЕ В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

© 2023 г. Е. И. Гулк<sup>а</sup>, Е. Б. Замяткина<sup>а</sup>, К. Биркемайер<sup>б</sup>, Е. Р. Тараховская<sup>а, с, \*</sup>

<sup>а</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>б</sup> Университет Лейпцига, Лейпциг, Германия

<sup>с</sup> Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова  
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: elena.tarakhovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 22.07.2022 г.

После доработки 27.09.2022 г.

Принята к публикации 28.09.2022 г.

Проведено исследование общего биохимического состава и профиля низкомолекулярных метаболитов клеток эвглены (*Euglena gracilis* Klebs.), растущих в миксотрофной культуре с добавлением 0.5% этанола, глюкозы, бутанола, глицина или глицерина. Этанол и глюкоза существенно стимулировали рост культуры эвглены и накопление в клетках запасных соединений (парамиллона и восковых эфиров). Бутанол также способствовал делению клеток эвглены и усилению биосинтеза белка, моно- и дисахаридов, каротиноидов и токоферолов. Глицин и глицерин усваивались медленнее, чем другие субстраты, и накапливались в клетках *E. gracilis* вместе со своими непосредственными производными. Глицин не стимулировал рост культуры, но вызывал накопление в клетках парамиллона, органических кислот цикла Кребса и азотсодержащих метаболитов (хлорофилла, свободных аминокислот и азотистых оснований). По-видимому, в условиях миксотрофии глицин одинаково эффективно используется эвгленой как дополнительный источник углерода, и азота. Усвоение глицерина сопровождалось накоплением в клетках эвглены восковых эфиров, а также аминокислот пролина и орнитина. В целом, полученные результаты демонстрируют способность эвглены существенно перестраивать свой метаболизм при усвоении органических субстратов различной химической природы. Данные могут быть использованы в контексте прикладного применения *E. gracilis*.

**Ключевые слова:** *Euglena gracilis*, бутанол, восковые эфиры, глицерин, глицин, метаболомика, миксотрофия, токоферол

**DOI:** 10.31857/S0015330322600462, **EDN:** GKQPWG

### ВВЕДЕНИЕ

*Euglena gracilis* Klebs. – пресноводная одноклеточная водоросль, которая легко культивируется в лабораторных условиях и используется как модельный объект для цитологических, биохимических и экологических исследований [1]. Для эвглены характерен миксотрофный тип питания: в дополнение к фотосинтетической ассимиляции углерода, она способна эффективно усваивать экзогенные органические субстраты различной химической природы – спирты, сахара, аминокислоты, жирные кислоты и др. [2, 3]. Спектр метаболизируемых эвгленой органических соединений чрезвычайно широк, что свидетельствует о высокой метаболической пластичности данного организма. Наличие в окружающей среде доступных источников органического углерода вызывает существенные изменения в клетках эвглены, затрагива-

ющие такие параметры, как форма и размер клеток, частота делений (и соответственно, скорость роста культуры), интенсивность фотосинтеза и дыхания, а также химический состав клеток [3–5].

Клетки автотрофной культуры *E. gracilis* имеют веретенообразную форму (~50 мкм в длину и 10 мкм в ширину), однако они способны изменять ее в широком диапазоне, вплоть до шарообразной, что используется эвгленами при так называемом метаболитующем движении. Возможность такого типа движения обеспечивается отсутствием клеточной стенки и поверхностным аппаратом в виде белковой пелликулы эвгленоидного типа. Основным локомоторным органом эвглены является длинный передний жгутик. Клетка *E. gracilis*, как правило, содержит одну крупную митохондрию, образующую обширную разветвленную сеть (митохондриальный ретикулум) [6]. Такая структура

обеспечивает эффективное клеточное дыхание, в том числе при усвоении экзогенных органических субстратов. На свету в клетках формируется 10–12 относительно крупных дисковидных хлоропластов, содержащих пиреноиды [7]. Основными фотосинтетическими пигментами *E. gracilis* являются хлорофиллы *a* и *b*,  $\beta$ -каротин, диатриоксантин и неоксантин [8]. В качестве запасных соединений в клетках могут накапливаться парамилон ( $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-глюкан) и восковые эфиры [9, 10]. Характерными особенностями метаболизма эвглены является зависимость от витаминов B<sub>1</sub> и B<sub>12</sub>, а также неспособность усваивать азот в форме нитрата и мочевины [11, 12].

В последние годы наблюдается повышение интереса к изучению метаболизма и биохимического состава *E. gracilis*. При этом подавляющее большинство работ имеет прикладной характер и очень узкую направленность. В центре внимания находятся два компонента клеток *E. gracilis*: парамилон и восковые эфиры. Эти соединения при определенных условиях накапливаются в клетках эвглены в значительных количествах (до 70–80% сухой массы) и имеют практическую ценность. Парамилон в настоящее время используется как биологически активная добавка к пище в Японии и США, а восковые эфиры рассматриваются как перспективное сырье для производства биодизельного топлива [9, 10]. В то время как накопление этих соединений клетками эвглены в условиях миксотрофии и гетеротрофии к настоящему моменту изучено достаточно подробно [13, 14], детальные исследования изменений общего биохимического состава *E. gracilis* при смене источников питания все еще очень немногочисленны. Наиболее хорошо изучено влияние на эвглену экзогенных этанола и глюкозы: эти субстраты стимулируют деление клеток, сопровождающееся накоплением запасных углеводов и снижением содержания фотосинтетических пигментов [4, 9, 15]. Однако процессы усвоения эвгленой субстратов, не вызывающих резкого ускорения роста культуры, исследованы значительно хуже. К таким соединениям относятся бутанол, глицерин, глицин, глутаминовая кислота и другие. Подобные субстраты упоминаются, в основном, лишь в качестве дополнительных компонентов питательных сред в сравнительных исследованиях роста культур эвглены при различных условиях [2, 3, 16]. Между тем, переход к миксотрофному питанию сопряжен не только с изменением скорости роста культуры микроводоросли, но, в первую очередь, с изменением биохимического состава клеток, их метаболома и протеома. В настоящее время метаболомные исследования, как правило, проводятся методом газовой хроматографии – масс-спектрометрией (ГХ-МС), поскольку этот подход позволяет одновременно анализировать сотни соединений, задействованных в первичном и вторичном мета-

болизме клеток. За последние 20 лет этот метод хорошо зарекомендовал себя в исследованиях метаболитных профилей различных макро- и микроводорослей, как живущих в естественных условиях, так и культивируемых [17, 18]. Нам удалось найти лишь несколько работ по метаболомике эвглены, и все они ориентированы на поиск оптимальных условий культивирования клеток для интенсификации накопления жирных кислот и восковых эфиров [19–21]. Прикладных работ более широкого профиля или фундаментальных исследований, которые бы анализировали особенности метаболома клеток *E. gracilis*, выращенных на разных органических субстратах в миксотрофных условиях, нами найдено не было.

Целью нашей работы является сравнение биохимического состава (в том числе метаболитного профиля) клеток *E. gracilis*, растущих миксотрофно в присутствии органических субстратов разной химической природы. Мы полагаем, что детальное изучение биохимических адаптаций эвглены к условиям углеродного питания позволит лучше понять механизмы метаболической пластичности этого организма и существенно дополнит фундаментальную научную базу, необходимую для эффективного прикладного использования микроводорослей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом данного исследования является микроводоросль *Euglena gracilis* Klebs. штамм Z. Культура *E. gracilis* была получена из коллекции Ресурсного центра СПбГУ “Культивирование микроорганизмов” (клон CALU 520).

Водоросли выращивали на среде Cramer-Myers [22] при температуре 25°C, постоянном освещении (50 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup> с)) и перемешивании. Культуры эвглены росли в условиях автотрофии (минеральная среда) и миксотрофии (среда с добавлением органических субстратов, 0.5%, w/v). В качестве субстратов использовали этанол, бутанол, глюкозу, глицин и глицерин.

Постановку экспериментов проводили следующим образом. Автотрофную культуру, находящуюся в фазе экспоненциального роста, разводили минеральной средой до концентрации примерно 100 тыс. клеток на мл. Аликвоты суспензии (25 мл) помещали в конические колбы объемом 100 мл, после чего вносили соответствующие органические субстраты. Для изучения динамики роста культур ежедневно в течение 14 дней осуществляли подсчет клеток в суспензиях с помощью камеры Горяева (клетки предварительно фиксировали раствором Люголя). У культур, находящихся в начале фазы экспоненциального роста, оценивали следующие параметры: общее содержание углеводов, общее содержание белка, со-



держание хлорофиллов *a* и *b*, общее содержание каротиноидов, а также профиль низкомолекулярных метаболитов.

Общее содержание углеводов в клетках *E. gracilis* определяли спектрофотометрически с помощью антронового метода [23]. Предварительно клетки отмывали от культуральной жидкости, четыре раза промывая их минеральной средой. К 0.3 мл суспензии клеток приливали 3 мл антронового реактива, полученную смесь 7 мин кипятили на водяной бане, после чего остужали на льду. Измерение оптической плотности растворов проводили на длине волны 620 нм с помощью спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Россия). Общее содержание углеводов рассчитывали на основе калибровочного графика с глюкозой в качестве стандарта.

Общее содержание белка определяли по методу Лоури. Для полной экстракции белка, клетки (предварительно отмывые от культуральной жидкости) осаждали центрифугированием (5000 g, 5 мин), заливали осадок 3 мл смеси додецилсульфата натрия (0.5%) и NaOH (0.5 M) и кипятили на водяной бане в течение 20 мин. Далее содержание белка в экстрактах определяли спектрофотометрически (СФ-46,  $\lambda = 750$  нм) по стандартному протоколу с реактивом Фолина-Чокальтеу. В качестве белкового стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США) (калибровочные растворы были приготовлены на смеси додецилсульфата натрия и NaOH).

Для экстракции пигментов клетки *E. gracilis* (500–800 тыс. клеток) осаждали центрифугированием (5000 g, 5 мин) и добавляли к осадку 3 мл ацетона с небольшим количеством  $MgCO_3$ . Пробы выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего экстракты центрифугировали (5000 g, 10 мин). Содержание хлорофиллов *a* и *b* и общее содержание каротиноидов определяли спектрофотометрически (СФ-46), производя расчеты по опубликованным формулам [24, 25].

При проведении метаболомного анализа пробы по 4 млн. клеток *E. gracilis* фиксировали, смешивая с охлажденным ( $-25^\circ C$ ) 32.5% метанолом (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1 : 4 [26], осаждали центрифугированием (5000 g, 3 мин), отмывали от культуральной жидкости и заливали 1 мл 100% метанола для экстракции низкомолекулярных метаболитов. Далее метанольные экстракты переносили в полипропиленовые пробирки объемом 1.5 мл (VWR, Германия), высушивали при помощи вакуум-концентратора (CentriVar, Labconco, США) и хранили затем при  $-80^\circ C$  для последующего анализа. Метаболомный анализ проводили методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии (ГХ-МС) по протоколу Hutschenreuther с соавт. [27]. Высушенные экстракты подвергались двухэтапной дериватизации: в пиридиновом растворе метоксиамин-гидрохло-

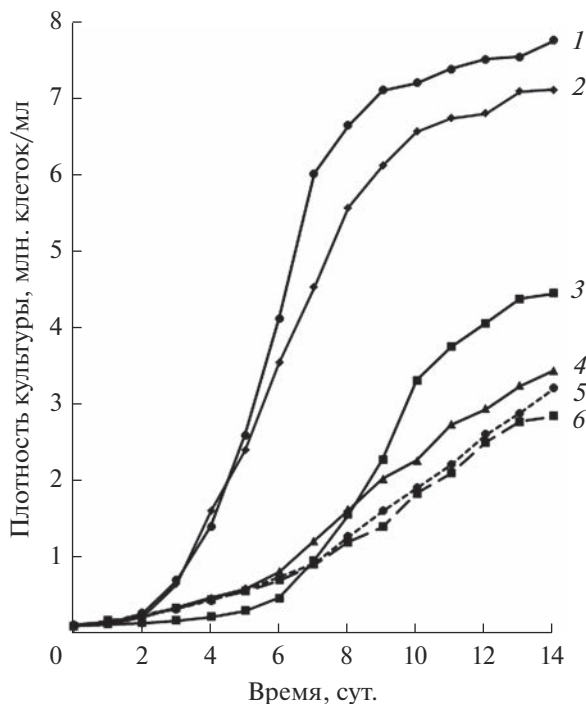
рида (Sigma-Aldrich, США) и *N*, *O*-бис(триметилсилил)-трифторацетамиде (Macherey-Nagel, Германия). После дериватизации пробы анализировали с помощью газового хроматографа Agilent 6890 (хроматографическая колонка DB-5 MS, газ-носитель — гелий, скорость потока — 0.9 мл/мин, режим без деления потока, температура инжектора  $250^\circ C$ , температурный режим — начальная температура  $40^\circ C$  удерживалась 1 мин, затем повышение со скоростью  $15^\circ C/мин$  до  $70^\circ C$ , одна минута при  $70^\circ C$ , далее повышение со скоростью  $6^\circ C/мин$  до  $350^\circ C$ ), соединенного с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 5971N (Agilent Technologies, Германия) со стандартной электронной ионизацией  $70$  эВ.

Для расчета индексов удерживания Ковача (RI) к каждой анализируемой последовательно проб добавляли пробу, содержащую смесь алканов ( $C_{10}-C_{32}$ ) в гексане [28]. Для идентификации ожидаемых соединений использовали смесь стандартов, содержащую 21 аминокислоту, 20 сахаров и сахароспиртов и 19 органических кислот. Деконволюцию хроматографических пиков проводили с использованием программы AMDIS 2.65. Индексы удерживания рассчитывались автоматически с помощью файла калибровки AMDIS, содержащего время удерживания каждого алкана. Для идентификации метаболитов, помимо стандартов, использовали библиотеки масс-спектров Golm metabolome database [29] и NIST (США). Интегрирование пиков экстрагированных ионов ( $m/z \pm 0.5$ ) при определенных временах удерживания проводили с помощью программы Xcalibur 3.0.

Количество биологических повторностей при проведении экспериментов составило 3–4 для метаболомных исследований и 8–12 для остальных анализов. Для статистической обработки и нормализации данных, а также для создания рисунков использовали программное обеспечение Excel 2016 и MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>). На рисунках представлены средние арифметические значения величин и стандартные отклонения. Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента при  $P < 0.05$ . На рисунках значения, между которыми наблюдались достоверные различия, отмечены разными буквами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Динамика роста культуры *E. gracilis*.** Все использованные в данной работе органические субстраты, за исключением глицина, стимулировали рост культуры *E. gracilis*. Типичные ростовые кривые культуры эвглены, полученные в автотрофных и миксотрофных условиях представлены на рис. 1. Наиболее интенсивный рост наблюдался в средах с добавлением этанола и глюкозы (рис. 1,

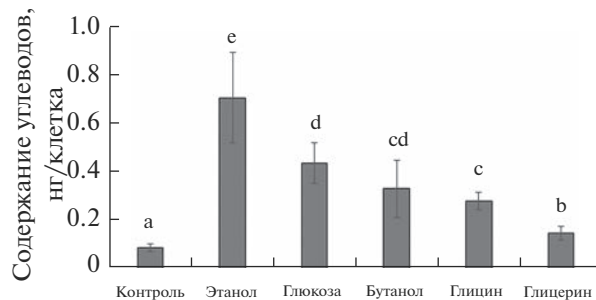


**Рис. 1.** Типичные ростовые кривые культур *Euglena gracilis*, выращенных миксотрофно в присутствии 0.5% этанола (1), глюкозы (2), бутанола (3), глицерина (4), глицина (5) или автотрофно (6).

кривые 1–2) – в таких условиях плотность культур через 14 сут после начала эксперимента в 2.5–3 раза превышала контроль (рис. 1, кривая 6). Бутанол также существенно стимулировал деления клеток *E. gracilis*: после 14 сут роста в присутствии этого субстрата плотность культуры была примерно в полтора раза выше, чем в контроле (рис. 1, кривые 3 и 6). Плотность культуры, растущей на среде с добавлением глицерина, начиная с 7-х сут эксперимента, также достоверно ( $P < 0.05$ ) превышала плотность автотрофной культуры (в среднем, на 30%) (рис. 1, кривые 4 и 6). По сравнению с культурами, растущими в средах с добавлением этанола и глюкозы, культуры, растущие на бутаноле и глицерине, характеризовались увеличенной продолжительностью лаг-фазы и переходили к интенсивному росту лишь через 6–7 сут после начала эксперимента. Глицин в нашем исследовании не оказал влияния на скорость роста культуры эвглены (рис. 1, кривая 5).

**Общий биохимический состав клеток *E. gracilis*.**

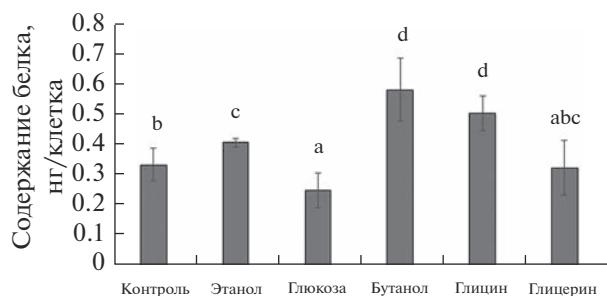
Данные по содержанию углеводов, белка и пигментов в клетках эвглены представлены на рис. 2–5. В присутствии всех исследованных субстратов клетки эвглены в начале экспоненциальной фазы роста культуры содержали значительно больше углеводов, чем в контроле (рис. 2). В присутствии бутанола, глицина и, в меньшей степени, этанола также наблюдалось увеличение общего содержания



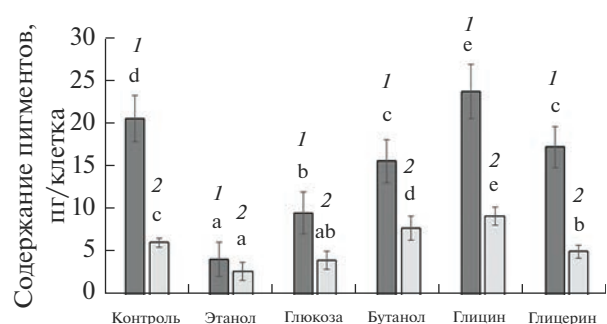
**Рис. 2.** Общее содержание углеводов в клетках *Euglena gracilis* в начале экспоненциальной фазы роста при выращивании в автотрофных (контроль) и миксотрофных условиях. Значения, отмеченные разными буквами, различаются достоверно ( $t$ -тест,  $P < 0.05$ ).

белка в клетках (рис. 3). Наибольшее содержание углеводов (705 пг на клетку) при миксотрофном росте достигалось в присутствии этанола, наименьшее (149 пг на клетку) – в присутствии глицерина (рис. 2). Наиболее значительное накопление белка (на 73% выше, чем в контроле) было отмечено в клетках, метаболизирующих бутанол. Содержание фотосинтетических пигментов в клетках эвглены (рис. 4), в целом, обратно пропорционально скорости роста культуры и накоплению углеводов. В присутствии наиболее эффективно усваиваемых субстратов (этанол, глюкоза, бутанол) содержание хлорофилла *a* составило, соответственно, от 21 до 76% от автотрофного контроля. Наиболее значимым исключением в данном случае является глицин – усвоение этого субстрата сопровождалось увеличением содержания фотосинтетических пигментов в клетках (рис. 4). В присутствии бутанола наблюдалось снижение количества хлорофилла в клетках, но рост общего количества каротиноидов. Содержание хлорофилла *b* в клетках эвглены составило примерно от 4 до 7% от суммы хлорофиллов (рис. 5). Максимальные значения этого параметра были получены для культур, растущих в средах с добавлением этанола, глюкозы и бутанола.

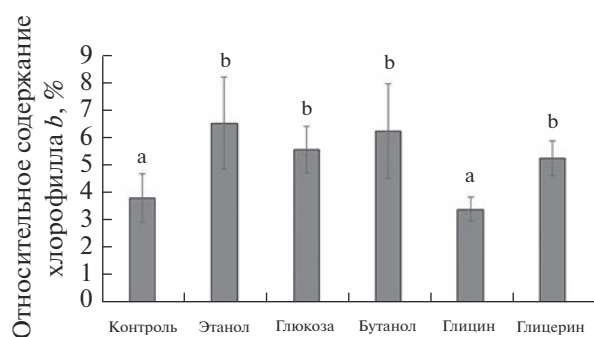
**Данные метаболического профайлинга.** ГХ-МС-анализ позволил выявить в клетках *E. gracilis* 324 метаболита. Из них более половины было идентифицировано на основании показателей RI и сходства спектров, а также с использованием стандартов. В пробах обнаружено 40 различных углеводов, 28 метаболитов липидного обмена (жирные кислоты, жирные спирты и их эфиры) и 19 аминокислот, в том числе 3 непротеиногенные аминокислоты ( $\beta$ -аланин, гомосерин и орнитин). Кроме того, были найдены азотистые основания (аденин, гуанин и урацил), витамины (биотин, никотинамид,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -токоферолы), мочевины, АМФ, терпеноиды (фитол, сквален) и другие соединения. Доминирующими соединениями являются маннит, трегалоза, производные глюкозы, яблочная кис-



**Рис. 3.** Общее содержание белка в клетках *Euglena gracilis* в начале экспоненциальной фазы роста при выращивании в автотрофных (контроль) и миксотрофных условиях. Значения, отмеченные разными буквами, различаются достоверно ( $t$ -тест,  $P < 0.05$ ).



**Рис. 4.** Содержание хлорофилла *a* (1) и каротиноидов (2) в клетках *Euglena gracilis* в начале экспоненциальной фазы роста при выращивании в автотрофных (контроль) и миксотрофных условиях. В каждом ряду значения, отмеченные разными буквами, различаются достоверно ( $t$ -тест,  $P < 0.05$ ).



**Рис. 5.** Доля хлорофилла *b* в сумме хлорофиллов клеток *Euglena gracilis* в начале экспоненциальной фазы роста при выращивании в автотрофных (контроль) и миксотрофных условиях. Значения, отмеченные разными буквами, различаются достоверно ( $t$ -тест,  $P < 0.05$ ).

лота, аланин, глутаминовая кислота, а также восковые эфиры – специфические метаболиты *E. gracilis*.

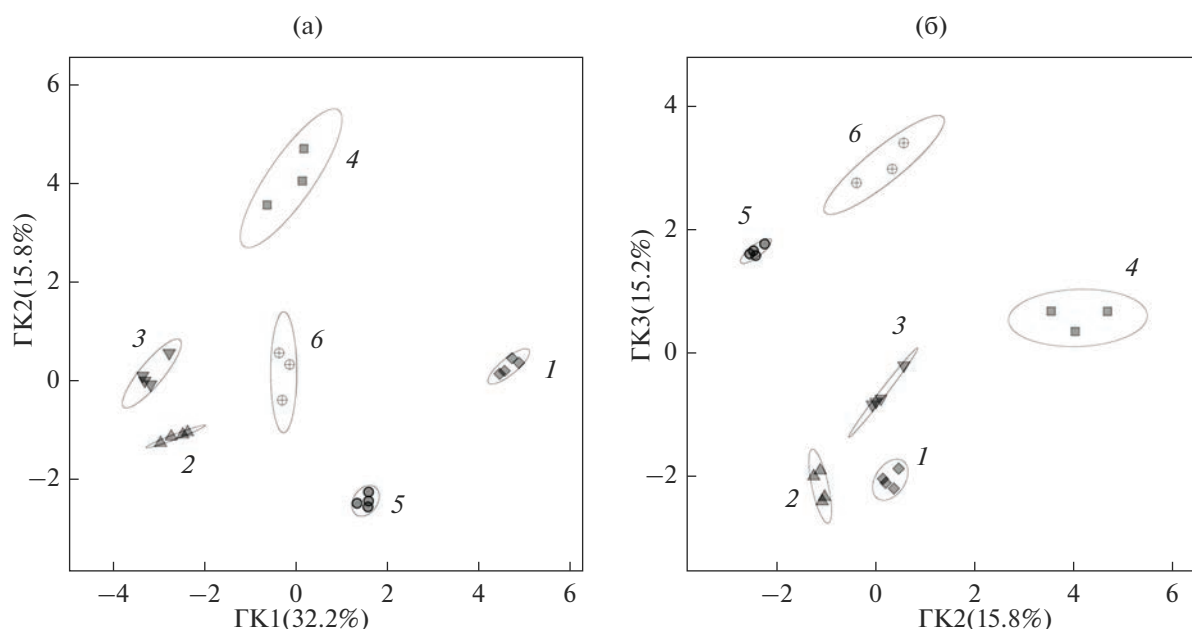
Анализ полученных данных методом главных компонент (МГК) позволил выявить основные тенденции изменения метаболитного профиля

клеток эвглени при разных вариантах миксотрофии (рис. 6). Относительное содержание идентифицированных метаболитов, имеющих максимальные по модулю значения нагрузок в МГК-анализе, представлено в виде теплокарты на рис. 7. Первые три главные компоненты (ГК) объясняют 63% дисперсии. По ГК 1 все образцы разделяются на 3 кластера: первый кластер включает пробы автотрофных культур, во второй попадают культуры, растущие на трудноусваиваемых субстратах (бутанол, глицерин, глицин), и наконец, третий кластер объединяет культуры, усваивающие этанол и глюкозу и характеризующиеся наиболее интенсивным ростом (рис. 6). Наибольший вклад в эту компоненту вносят сахара и их производные, метаболиты липидного обмена (жирные кислоты, восковые эфиры), фитол и некоторые аминокислоты. Для клеток автотрофных культур характерно относительно высокое содержание мио-инозитол-фосфата, трегалозы, а также других дисахаридов и их производных. Усвоение этанола и глюкозы приводит к накоплению в клетках эвглени большого количества разнообразных восковых эфиров (пальмитил-пальмитат, цетил-мириститат и др.) (рис. 7). ГК 2 выделяет в отдельные кластеры метаболиты клеток *E. gracilis*, выращенных в присутствии бутанола и глицина. Анализ нагрузок этой компоненты показывает, что для клеток, метаболизирующих бутанол, характерно накопление ряда моно- и дисахаридов (глюкоза, мальтоза, рибоза), а также токоферолов. Усвоение глицина сопровождается повышением содержания в клетках эвглени ряда аминокислот (глицин, изолейцин, серин), органических кислот цикла Кребса (лимонная, яблочная и др.) и азотистых оснований (аденин, гуанин) (рис. 7). Анализ нагрузок ГК 3 позволяет выявить особенности метаболитного профиля клеток *E. gracilis*, выращенных в присутствии глицерина. Усвоение этого субстрата сопровождается накоплением ряда сахаров, аминокислот (включая непротеиногенную аминокислоту орнитин) и восковых эфиров (цетил-мириститат, цетил-пальмитат и др.).

## ОБСУЖДЕНИЕ

При переходе от фотоавтотрофии к миксотрофному питанию клетки *E. gracilis* получают дополнительный органический материал и энергию, включая в метаболизм экзогенные субстраты. Анализ полученных нами данных показывает, что эвглена реализует принципиально разные пути использования этого дополнительного ресурса в зависимости от химической структуры метаболизируемого соединения.

Известно, что растущие культуры микроорганизмов проходят несколько стадий, характеризующихся разной частотой деления клеток. На протяжении первой стадии (лаг-фазы) рост культуры



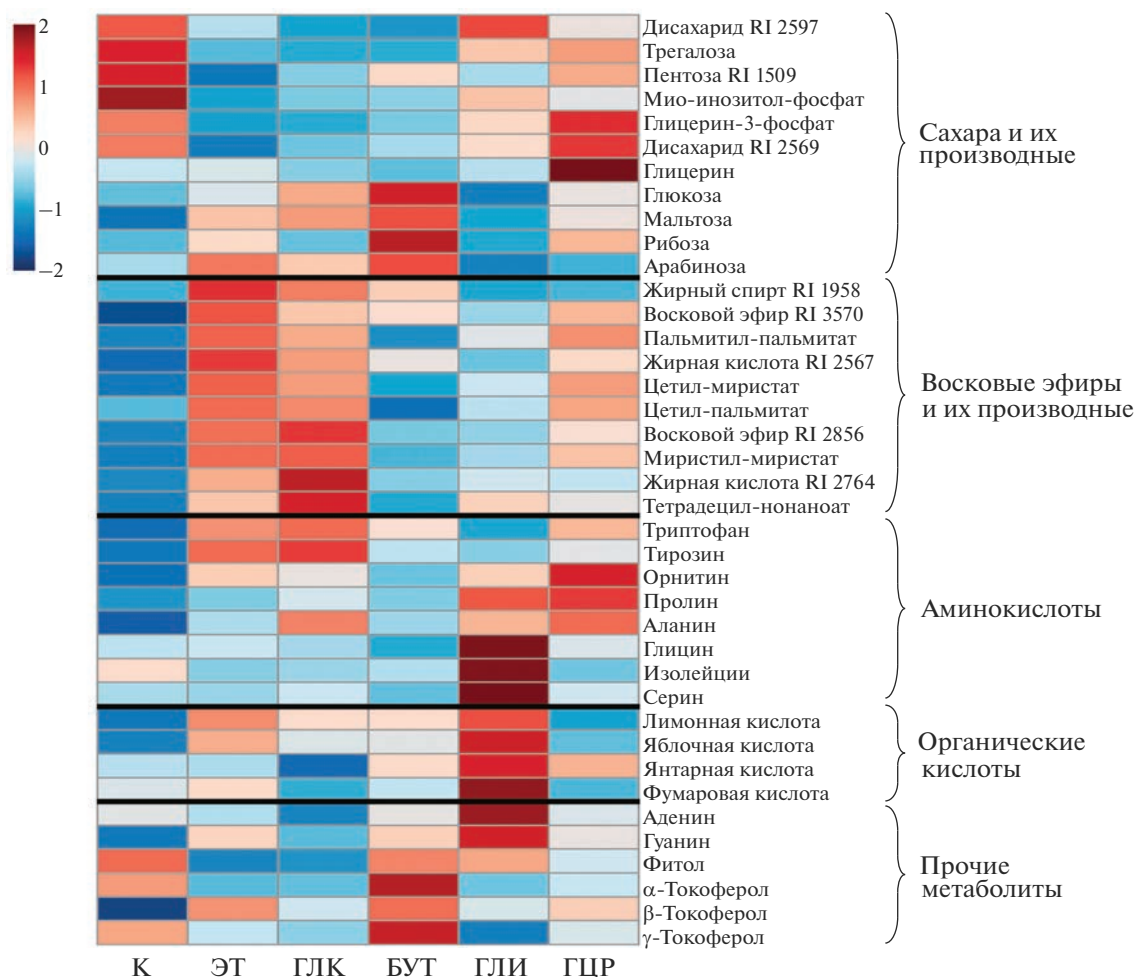
**Рис. 6.** Результаты анализа профилей низкомолекулярных метаболитов клеток *Euglena gracilis* с помощью метода главных компонент (ГК). Клетки выращены автотрофно (1) и миксотрофно с добавлением 0.5% этанола (2), глюкозы (3), бутанола (4), глицина (5) и глицерина (6).

замедлен — в этот период клетки адаптируются к изменению условий среды и накапливают ресурсы для последующей интенсификации делений [30]. Естественно, продолжительность лаг-фазы при переходе культуры к миксотрофному питанию напрямую зависит от того, насколько обширные и сложные метаболические перестройки требуются клеткам для усвоения конкретного органического субстрата. Относительно малая продолжительность (2 сут) лаг-фазы у культур *E. gracilis*, растущих в среде с добавлением этанола и глюкозы (рис. 1, кривые 1–2), свидетельствует о том, что эти субстраты легко метаболизируются данным организмом, что соответствует литературным данным [4, 9, 15]. В присутствии других органических соединений продолжительность лаг-фазы была существенно увеличена (до 5–6 сут) (рис. 1, кривые 3–5), что характеризует эти субстраты как относительно трудноусваиваемые.

Следующей стадией развития культуры является фаза экспоненциального роста, во время которой происходит быстрое увеличение биомассы микроорганизмов за счет активации клеточных делений. В этот период в клетках активно идут биосинтетические процессы, повышается интенсивность энергетического обмена и усвоения минеральных соединений [31]. Очевидно, именно на этой стадии в миксотрофных культурах устанавливается баланс между потреблением неорганического и органического углерода, и биохимический состав клеток в наибольшей степени адаптирован к текущим условиям питания. По этой причине все

биохимические характеристики *E. gracilis*, исследованные в данной работе, были проанализированы в клетках культур, находящихся в начале фазы экспоненциального роста. Наиболее интенсивный рост культуры эвглены на этой стадии наблюдался в присутствии этанола и глюкозы (рис. 1, кривые 1–2). Относительно невысокая скорость роста культуры в присутствии бутанола и глицерина, по-видимому, связана с более низкой эффективностью усвоения данных субстратов. Увеличенная продолжительность лаг-фазы и менее интенсивный рост культур эвглены на бутаноле, по сравнению с этанолом, были показаны ранее [3].

Помимо ускорения роста культуры, органические субстраты также используются эвгленой и для стимулирования роста индивидуальных клеток: биосинтеза структурных компонентов и запасных соединений. Результаты определения общего содержания углеводов, по-видимому, главным образом характеризуют количество парамилона в клетках, поскольку этот запасной полисахарид является доминирующим углеводным метаболитом *E. gracilis* [14]. Основным низкомолекулярным углеводом, который мог бы вносить вклад в реакцию с антроном, является трегалоза, однако по нашим данным изменение ее содержания в клетках не коррелирует с изменением общего содержания углеводов (рис. 2, 7). Таким образом, мы интерпретируем увеличение содержания углеводов, наблюдаемое в миксотрофных условиях, как накопление парамилона в клетках эвглены. Увеличение количества запасного полисахарида,



**Рис. 7.** Относительное содержание ряда идентифицированных метаболитов в клетках *Euglena gracilis*, выращенных автотрофно (контроль, К) и миксотрофно с добавлением 0.5% этанола (ЭТ), глюкозы (ГЛК), бутанола (БУТ), глицина (ГЛИ) и глицерина (ГЦР).

по сравнению с автотрофным контролем, подтверждает способность *E. gracilis* к усвоению всех рассмотренных субстратов, в том числе глицина, не стимулирующего рост культуры (рис. 1). Это подтверждается и данными МГК-анализа метаболитных профилей клеток эвглены: ГК 1, объясняющая наибольшую долю общей дисперсии, четко отделяет пробы контроля от всех проб миксотрофных культур (рис. 6). Такая кластеризация проб указывает на то, что наиболее значимым фактором, повлиявшим на биохимический состав эвглены, является сам переход к миксотрофии, который был обеспечен всеми использованными субстратами. Согласно литературным данным, накопление парамиллона (рис. 2) и восковых эфиров (рис. 7), сопровождающееся снижением содержания хлорофилла (рис. 4), типично для клеток *E. gracilis*, растущих на средах с этанолом и глюкозой [4, 9]. Однако, данные по влиянию этих субстратов на содержание белка в клетках микроводорослей не столь однозначны. Так, в работе

Garlaschi с соавт. [4] было показано, что при выращивании культур эвглены в присутствии этанола содержание белка в клетках снижалось, что не подтверждается нашими результатами (рис. 3). Относительно низкое содержание хлорофилла *b* в клетках эвглены по сравнению с зелеными микроводорослями (рис. 5) соответствует литературным данным [8]. Увеличение содержания дополнительного хлорофилла в клетках наиболее интенсивно растущих культур может быть связано со снижением общего уровня освещенности клеток в более плотных суспензиях.

Поскольку результаты, полученные с использованием глюкозы и этанола, во многом совпадают с литературными данными, дополняя их в части влияния этих субстратов на содержание в клетках *E. gracilis* белка и ряда низкомолекулярных метаболитов, мы в данной работе сосредоточимся на обсуждении усвоения эвгленой других, значительно менее исследованных, экзогенных источников органического углерода.

Биохимические процессы, происходящие в клетках *E. gracilis* при усвоении бутанола, глицина и глицерина детально исследуются впервые. Интересно, что изменения метаболизма эвглени при росте на этих относительно трудноусваиваемых субстратах, наряду со специфическими особенностями, имеют и ряд общих черт. На это указывают результаты МГК-анализа метаболомных данных: пробы культур, выращенных на этих трех субстратах, фактически формируют один крупный кластер на уровне ГК 1, отделяясь и от проб контроля, и от проб культур, выращенных на легкоусваиваемых этаноле и глюкозе (рис. 6). Общими характеристиками клеток, метаболизирующих бутанол, глицерин и глицин являются умеренное содержание парамилонина и восковых эфиров, а также большее разнообразие накапливаемых сахаров и аминокислот, по сравнению как с автотрофным контролем, так и с культурами, интенсивно растущими на этаноле и глюкозе (рис. 7). Очевидно, что из этих трех субстратов, бутанол усваивается данным штаммом эвглени наиболее эффективно. При этом возникающий в клетках избыток органического вещества инвестируется как в рост культуры (рис. 1), так и в разнообразные биосинтетические процессы, о чем свидетельствует увеличение содержания парамилонина, ряда низкомолекулярных углеводов, белка и каротиноидов (рис. 2–4, 7). Снижение содержания хлорофилла *a* в клетках эвглени, хоть и не столь значительное, как на этанол-содержащей среде (рис. 4), позволяет предположить, что усвоение бутанола сопровождается снижением интенсивности фотосинтетических процессов. Метаболические пути усвоения бутанола в клетках *E. gracilis* не исследованы, однако было показано, что этот спирт может окисляться митохондриальной алкогольдегидрогеназой наряду с этанолом [32]. У бактерий, способных к метаболизации бутанола (например, *Pseudomonas putida*), он окисляется алкоголь- и альдегид-дегидрогеназами до бутирата, который затем подвергается  $\beta$ -окислению и включается в глиоксилатный цикл [33]. Можно предположить, что включение бутанола в метаболизм *E. gracilis* происходит по сходной схеме. Метаболомные данные показывают повышение содержания ряда метаболитов цикла Кребса и глиоксилатного цикла (лимонная, яблочная, и янтарная кислоты) в клетках, растущих в присутствии бутанола, по сравнению с контролем (рис. 7). Накопление в этих клетках сахаров (глюкоза, мальтоза) может свидетельствовать об активном сопряжении глиоксилатного цикла с процессом глюконеогенеза. Интересная особенность метаболитного профиля эвглени, ассимилирующей бутанол, — это повышенное содержание токоферолов (рис. 7). Этот результат может иметь практическую ценность, поскольку эвглена известна как хороший продуцент альфа- и гамма-токоферолов [14]. Исходя из

полученных нами данных, имеет смысл рассмотреть бутанол в качестве субстрата при культивировании *E. gracilis* для промышленного получения витамина Е.

Общей чертой культур эвглени, выращенных на средах с глицерином и глицином, является повышенное содержание в клетках самих этих соединений и их непосредственных производных (например, глицерин и глицерин-3-фосфат) (рис. 7). Это свидетельствует об относительно низкой скорости метаболизации данных субстратов по сравнению, например, с глюкозой, которая даже в клетках, имеющих экзогенный источник этого соединения, не является преобладающим метаболитом (рис. 7). Несмотря на то, что эти субстраты не относятся к одному классу химических соединений, данные МГК-анализа показывают, что их усвоение приводит к сходным биохимическим перестройкам. Так же, как и для пары этанол-глюкоза, на уровне первых трех ГК пробы культур, выращенных на глицерине и глицине располагаются относительно близко друг к другу (рис. 6). Анализ нагрузок ГК показывает, что все эти пробы характеризуются относительно высоким содержанием трегалозы, по сравнению с пробами других миксотрофных культур, накоплением некоторых аминокислот и ряда неидентифицированных метаболитов, которые еще предстоит исследовать (рис. 7). Из всех использованных в данной работе органических субстратов *E. gracilis* наименее эффективно усваивала глицерин. В присутствии этого субстрата клетки эвглени содержали наименьшее (хотя и вдвое превышающее контроль) количество парамилонина и не накапливали белок (рис. 2–3). Относительно большая продолжительность лаг-фазы при росте культуры указывает на значительные перестройки метаболизма клеток эвглени, что подтверждается детальным анализом профиля низкомолекулярных метаболитов (рис. 6–7). Известно, что глицерин способен проникать в клетки микроорганизмов путем простой диффузии [34]. Особенности метаболизации глицерина у эвглени в настоящее время не изучены, однако у других микроводорослей этот процесс включает в себя образование глицерин-3-фосфата и его последующее окисление до глицеральдегид-3-фосфата — соединения, которое стоит на пересечении ключевых метаболических путей [35, 36]. Дальнейшая ассимиляция, по-видимому, осуществляется через реакции цикла Кребса. Полученные нами результаты, в целом, не противоречат этой схеме, поскольку одновременно с накоплением глицерина в клетках отмечается и накопление глицерин-3-фосфата. Можно предположить, что часть глицерин-3-фосфата расходуется на синтез липидов, поскольку мы видим увеличение относительного содержания метаболитов липидного обмена в присутствии глицерина (рис. 7). Стимулирование биосинтеза липидов при усвоении

глицерина клетками *E. gracilis* было показано в недавних исследованиях возможного биотехнологического применения эвглены [36]. Относительно высокое содержание ряда моно- и дисахаридов указывает также на возможную активацию процессов глюконеогенеза (рис. 7). Еще одна характерная черта метаболического профиля эвглены, растущей в присутствии глицерина, это накопление ряда свободных аминокислот, особенно пролина и орнитина (рис. 7). Эти две аминокислоты метаболически связаны: орнитин является одним из предшественников в биосинтезе пролина [37]. Таким образом, можно интерпретировать эти данные как усиление биосинтеза пролина в клетках *E. gracilis*. Поскольку пролин является одним из низкомолекулярных осмолитов, накапливающихся в клетках растений при гипертоническом стрессе, повышение его содержания может быть связано со снижением водного потенциала среды в присутствии глицерина в связи с относительно низкой скоростью поглощения и усвоения этого субстрата.

Хотя аминокислоты часто включаются в питательные среды на основе глюкозы как дополнительные азотсодержащие компоненты [16, 38, 39], использование микроводорослями этих субстратов в качестве единственных источников органического углерода очень мало исследовано. Единичные работы, в которых рассматривалось усвоение эвгленой нескольких аминокислот [2, 40] свидетельствуют о том, что они используются в метаболизме этой водоросли не только как дополнительный источник азота. Эксперименты с применением <sup>14</sup>C-метки показали, что около 50% проникших в клетки глутамата, глицина, аспартата и фенилаланина включается в состав органических соединений. При ассимиляции глицина было показано включение радиоактивной метки в свободные аминокислоты (серин, цистеин), пуриновые азотистые основания и белок [40]. Это полностью согласуется с нашими данными о биохимическом составе клеток *E. gracilis*, выращенных на среде с добавлением глицина. Поскольку глицин является одновременно источником и углерода, и азота, этот ресурс инвестируется, в первую очередь, в биосинтез азотсодержащих молекул: в клетках эвглены возросло содержание белка, хлорофилла *a*, свободных аминокислот, аденина и гуанина (рис. 3, 4, 7). Глицин может включаться в метаболизм через митохондриальные реакции фотодыхания, что приводит к быстрому синтезу и накоплению серина (рис. 7). Формирующийся в дальнейшем пируват может поступать либо в цикл Кребса, стимулируя синтез органических кислот (рис. 7), либо в глюконеогенез, вызывая накопление углеводов (рис. 2). Избыток азота выделяется в среду в виде аммиака [2]. Интересно, что, хотя усвоение глицина, очевидно, происходит достаточно эффективно и сопровождается биосинтезом белка и нуклеиновых

кислот, этот субстрат в использованной нами концентрации не стимулировал деления клеток в культуре *E. gracilis* (рис. 1). Этот результат подтверждает данные Murray с соавт. [2], которые показали, что при усвоении глицина, как единственного источника углерода, культура эвглены растет со скоростью, типичной для фотоавтотрофного роста.

В целом, полученные результаты демонстрируют способность эвглены существенно перестраивать свой метаболизм при усвоении органических субстратов различной химической природы в режиме миксотрофии. По-видимому, в присутствии наиболее эффективно усваиваемых субстратов, этанола и глюкозы, дополнительные биохимические ресурсы затрачиваются, преимущественно, на усиление роста культуры, а также на синтез и накопление запасных соединений. При этом в клетках эвглены одновременно стимулируется образование как парамилона, так и восковых эфиров. Умеренное накопление восковых эфиров происходит также в присутствии глицерина. Усвоение бутанола сопровождается усилением разнообразных биосинтетических процессов, затрагивающих как первичный, так и вторичный метаболизм, о чем свидетельствует накопление токоферолов в клетках эвглены. Относительно медленно усваивающийся глицин, в первую очередь, стимулирует биосинтез азотсодержащих метаболитов. Выявленные в ходе данного исследования особенности метаболизма *E. gracilis* при миксотрофном росте на трудноусваиваемых субстратах требуют дальнейшего, более детального изучения.

Данное исследование было выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00944).

Авторы выражают благодарность Наталье Ващуриной, Сюзан Биллиг и Валерии Лемешевой за техническую помощь при осуществлении этой работы.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buetow D.E. Euglena // Encyclopedia of life sciences (ELS). Chichester: John Wiley and Sons, Ltd, 2011. P. 1. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001964.pub3>
2. Murray D.R., Giovanelli J., Smillie R.M. Photoassimilation of glycolate, glycine and serine by *Euglena gracilis* // J. Protozool. 1970. V. 17. P. 99. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1970.tb05165.x>
3. Hosotani K., Ohkochi T., Inui H., Yokota A., Nakano Y., Kitaoka S. Photoassimilation of fatty acids, fatty alcohols and sugars by *Euglena gracilis* Z // Microbiology. 1988. V. 134. P. 61. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-61>

4. *Garlaschi F.M., Garlaschi A.M., Lombardi A., Forti G.* Effect of ethanol on the metabolism of *Euglena gracilis* // *Plant Sci. Lett.* 1974. V. 2. P. 29. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(74\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0304-4211(74)90035-2)
5. *Ogbonna J.C., Ichige E., Tanaka H.* Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 58. P. 532. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0901-8>
6. *Barsanti L., Gualtieri P.* Anatomy of *Euglena gracilis* // *Handbook of algal science, technology and medicine* / Ed. O. Konur. NY: Academic Press, 2020. P. 61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818305-2.00004-8>
7. *Klein S., Schiff J.A., Holowinsky A.W.* Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts: II. Normal development of fine structure and the consequences of preillumination // *Developmental Biology.* 1972. V. 28. P. 253. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(72\)90142-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(72)90142-X)
8. *Cunningham Jr.F.X., Schiff J.A.* Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll *b*: I. Pigment composition // *Plant Physiol.* 1986. V. 80. P. 223. <https://doi.org/10.1104/pp.80.1.223>
9. *Barsanti L., Vismara R., Passarelli V.* Paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions // *J. Appl. Phycol.* 2001. V. 13. P. 59. <https://doi.org/10.1023/A:1008105416065>
10. *Inui H., Ishikawa T., Tamoi M.* Wax ester fermentation and its application for biofuel production // *Euglena: biochemistry, cell and molecular biology* / Eds. S. Schwartzbach, S. Shigeoka. Springer International Publishing AG, 2017. P. 269
11. *Oda Y., Miyatake K., Kitaoka S.* Inability of *Euglena gracilis* Z to utilize nitrate, nitrite and urea as the nitrogen sources // *Bulletin of the University of Osaka Prefecture. Ser. B, Agriculture and biology.* 1979. V. 31. P. 43. <https://doi.org/10.24729/00009403>
12. *Watanabe F., Yoshimura K., Shigeoka S.* Biochemistry and physiology of vitamins in *Euglena* // *Euglena: biochemistry, cell and molecular biology* / Eds. S. Schwartzbach, S. Shigeoka. Springer International Publishing AG, 2017. P. 65. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1_5)
13. *Furuhashi T., Ogawa T., Nakai R., Nakazawa M., Okazawa A., Padermschoke A., Nishio K., Hirai M.Y., Arita M., Ohta D.* Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography-mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia // *Metabolomics.* 2015. V. 11. P. 175. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0687-1>
14. *Gissibl A., Sun A., Care A., Nevalaine H., Sunna A.* Bioproducts from *Euglena gracilis*: synthesis and applications // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2019. V. 7. P. 108. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108>
15. *Mokrosnop V.M.* Dynamics of chlorophyll and paramylon accumulation in *Euglena gracilis* cells at mixotrophic cultivation // *Studia Biologica.* 2016. V. 10. P. 141. <https://doi.org/10.30970/sbi.1002.483>
16. *Oda Y., Nakano Y., Kitaoka S.* Utilization and toxicity of exogenous amino acids in *Euglena gracilis* // *Microbiology.* 1982. V. 128. P. 853. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-4-853>
17. *Puzanskiy R.K., Shavarda A.L., Tarakhovskaya E.R., Shishova M.F.* Analysis of metabolic profile of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under autotrophic conditions // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51. P. 83. <https://doi.org/10.1134/S0003683815010135>
18. *Birkemeyer C., Osmolovskaya N., Kuchaeva L., Tarakhovskaya E.* Distribution of natural ingredients suggests a complex network of metabolic transport between source and sink tissues in the brown alga *Fucus vesiculosus* // *Planta.* 2019. V. 249. P. 377. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3009-4>
19. *Matsuda F., Hayashi M., Kondo A.* Comparative profiling analysis of central metabolites in *Euglena gracilis* under various cultivation conditions // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011. V. 75. P. 2253. <https://doi.org/10.1271/bbb.110482>
20. *Zeng M., Hao W., Zou Y., Shi M., Jiang Y., Xiao P., Lei A., Hu Z., Zhang W., Zhao L., Wang J.* Fatty acid and metabolomic profiling approaches differentiate heterotrophic and mixotrophic culture conditions in a microalgal food supplement “*Euglena*” // *BMC Biotechnol.* 2016. V. 16. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0279-4>
21. *Shao Q., Hu L., Qin H., Liu Y., Tang X.* Metabolomic response of *Euglena gracilis* and its bleached mutant strain to light // *PLoS One.* 2019. V. 14: e0224926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224926>
22. *Cramer M., Myers J.* Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis* // *Archiv. Mikrobiol.* 1952. V. 17. P. 384. <https://doi.org/10.1007/BF00410835>
23. *Hewitt B.R.* Spectrophotometric determination of total carbohydrate // *Nature.* 1958. V. 182. P. 246. <https://doi.org/10.1038/182246b0>
24. *Jeffrey S.W., Humphrey G.F.* New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton // *Biochem. Physiol. Pflanz.* 1975. V. 167. P. 191. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)
25. *Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R.* Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // *Biochem. Soc. Trans.* 1983. V. 11. P. 591. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
26. *Bolling C., Fiehn O.* Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation // *Plant Physiol.* 2005. V. 139. P. 1995. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071589>
27. *Hutschenreuther A., Kiontke A., Birkenmeier G., Birkemeyer C.* Comparison of extraction conditions and normalization approaches for cellular metabolomics of adherent growing cells with GC-MS // *Anal. Methods.* 2012. V. 4. P. 1953. <https://doi.org/10.1039/c2ay25046b>
28. *Kovats E.* Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone //



- Helv. Chim. Acta. 1958. V. 41. P. 1915.  
<https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703>
29. Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmüller E., Dörmann P., Weckwerth W., Gibon Y., Stitt M., Willmitzer L., Fernie A.R., Steinhauser D. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database // Bioinformatics. 2005. V. 21. P. 1635.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti236>
  30. Rolfe M.D., Rice C.J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A.D., Alston M., Stringer M.F., Betts R.P., Barrayani J., Peck M.W., Hinton J.C. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 686.  
<https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
  31. Puzanskiy R., Tarakhovskaya E., Shavarda A., Shishova M. Metabolomic and physiological changes of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae, Chlorophyta) during batch culture development // J. Appl. Phycol. 2018. V. 30. P. 803.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-017-1326-9>
  32. Ono K., Kawanaka Y., Izumi Y., Inui H., Miyatake K., Kitao S., Nakano Y. Mitochondrial alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Euglena gracilis* // J. Biochem. 1995. V. 117. P. 1178.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124841>
  33. Cuenca M.D.S., Roca A., Molina-Santiago C., Duque E., Armengaud J., Gómez-García M.R., Ramos J.L. Understanding butanol tolerance and assimilation in *Pseudomonas putida* BIRD-1: an integrated omics approach // Microb. Biotechnol. 2016. V. 9. P. 100.  
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12328>
  34. Neilson A.H., Lewin R.A. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry // Phycologia. 1974. V. 13. P. 227.  
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-13-3-227.1>
  35. Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., de-Bashan L.E., Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products // Water research. 2011. V. 45. P. 11.  
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.08.037>
  36. Khanra A., Rai M.P. Evaluation of mixotrophic cultivation of *Euglena gracilis* for lipid synthesis and FAME characterization towards biodiesel application // J. Sci. Ind. Res. 2018. V. 77. P. 359.
  37. Aral B., Kamoun P. The proline biosynthesis in living organisms // Amino Acids. 1997. V. 13. P. 189.  
<https://doi.org/10.1007/BF01372588>
  38. Hurlbert R.E., Rittenberg S.C. Glucose metabolism of *Euglena gracilis* var. bacillaris; growth and enzymatic studies // J. Protozool. 1962. V. 9. P. 170.  
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1962.tb02602.x>
  39. Buetow D.E. Amino acids as nitrogen sources for the growth of *Euglena gracilis* and *Astasia longa* // J. Protozool. 1966. V. 13. P. 585.  
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1966.tb01967.x>
  40. Kempner E.S., Miller J.H. The molecular biology of *Euglena gracilis*. III. General carbon metabolism // Biochemistry. 1965. V. 4. P. 2735.  
<https://doi.org/10.1021/bi00888a025>