

На правах рукописи



Тугбаева Анастасия Сергеевна

Ответные реакции растений *Nicotiana tabacum* L. и *Zinnia elegans* Jacq. на длительное действие ионов меди в среде

1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина (Екатеринбург, Россия), а также частично в лаборатории геномных исследований устойчивости растений к фитопатогенам Университета Внутренней Монголии (Хух-Хото, Китай).

Научный руководитель: Киселева Ирина Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент, зав. кафедрой экспериментальной биологии и биотехнологий ИЕНиМ УрФУ

Официальные оппоненты: Казнина Наталья Мстиславовна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск.

Высоцкая Лидия Борисовна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа.

Ведущая организация: Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Сыктывкар

Защита состоится 2 июня 2022 г. в 11.00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 24.1.138.01 по специальности 1.5.21. – «физиология и биохимия растений» (биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35.

Факс: (499)678-54-20, e-mail: ifr@ippras.ru; m-azarkovich@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук: <http://www.ippras.ru>

Автореферат разослан « » 2022 г.

Ученый секретарь совета по защите докторских и кандидатских диссертаций, кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

Актуальность темы исследования. Масштабное отчуждение сельскохозяйственных земель, их загрязнение ионами тяжелых металлов (ТМ), и как следствие, снижение урожайности и продуктивности растений – глобальные проблемы человечества. Распространение ТМ в среде – это неизбежный результат их использования для производства товаров бытового и производственного назначения. Их концентрации особенно высоки в местах добычи руд и металлургических производств. На загрязненных грунтах таких территорий растения вынуждены приспосабливаться к избытку ионов ТМ.

Медь как ТМ широко распространена в загрязненных почвах. Она – эссенциальный элемент, но в избыточных количествах токсична для живых организмов. Избыток ионов меди в тканях растений сопровождается образованием АФК в реакциях Габера – Вейса и приводит к развитию окислительного стресса (Ке, 2007; Elleuch et al., 2013). Длительное действие стрессора может сопровождаться подавлением роста растений и нарушением их жизненного цикла. Наряду с активной работой антиоксидантных систем одним из неспецифических путей приспособления растений к избытку ТМ в среде является их иммобилизация в клеточных стенках (КС) растений.

КС – сложный компартмент растительной клетки, способный благодаря катионно-обменным свойствам связывать ионы ТМ и ограничивать их транспорт в надземную часть растений, выполняя барьерную функцию. Обнаружены общие механизмы трансформации КС в ответ на разные виды абиотического и биотического стресса: перегруппировка основных компонентов и формирование между ними новых связей, биосинтез фенольных соединений, их локальное отложение в уязвимых местах КС (Тенхакен, 2015; Gigli-Bisceglia, 2019), как следствие, изменение механических свойств КС (растяжимость, упругость, жесткость и сопротивление).

В настоящий момент обсуждается роль активных форм кислорода (АФК), ионов кальция и 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, фитогормонов (салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислота) в активации сигнальных каскадов, приводящих к изменению механических свойств клеточных стенок. Показано участие транскрипционных факторов (ТФ) NAC, MYB, AP2/ERF, WRKY, bZIP и bHLH, и белков экспансинов, ксилоглюкан-эндотрансглюкозилаз, пектинметилэстераз, апопластных пероксидаз (Denness, 2011; Tsang, 2011; Wolf, 2012, Yadav, 2018) в этих процессах. Предполагается существование скоординированной передачи сигнала между датчиками целостности КС, АФК и фитогормонами.

В ответ на действие неблагоприятных факторов внешней среды во многих растениях стимулируется биосинтез фенольных соединений как антиоксидантов и предшественников лигнина. Эти реакции являются следствием изменения экспрессии генов *PAL*, *С4Н*, *4СL* и др. (Qingquan, 2018). Считается, что отложение лигнина повышает толерантность растений к ТМ за счет ограничения их подвижности в апопласте (Zeng, 2016). Понимание процессов адаптации растений к продолжительному действию ТМ остается не до конца ясным, что определяет актуальность данной работы.

Цели и задачи исследования.

Цель работы – изучение реакций растений *Nicotiana tabacum* и *Zinnia elegans* на длительное действие ионов меди.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние CuSO_4 на прорастание семян, линейные размеры и биомассу растений, их анатомо-морфологические характеристики;

2. Определить валовое содержание меди и ее доступных форм в субстрате, корне и побеге при длительной обработке CuSO_4 ;

3. Оценить количество пероксида водорода и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях корня и побега в условиях длительной обработки сульфатом меди;

4. Определить содержание фенолов и лигнина в корнях и стебле растений;

5. Выявить изменение относительного уровня транскриптов генов, кодирующих ферменты раннего этапа ФП и биосинтеза лигнина, а также ТФ, участвующих в их регуляции в условиях стресса, вызванного ионами меди.

Научная новизна полученных результатов. Впервые в длительном эксперименте показано влияние ионов меди на лигнификацию тканей корня и стебля модельных растений циннии и табака. Впервые показано изменение уровня транскриптов генов, кодирующих ферменты биосинтеза фенольных соединений и лигнина (*PAL*, *C4H*, *4CL*, *LAC*, *PRX*), а также белков-трансфакторов (*ERF1*, *ERF2*, *MYB1* и *MYB2*), участвующих в регуляции экспрессии указанных генов у циннии в условиях избытка CuSO_4 в среде. Впервые определена активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях корня и побега циннии. Установлены коррелятивные связи между экспрессией генов, количеством лигнина, фенольных соединений, маркеров стресса и количеством меди в тканях корня и побега при длительной обработке субстрата CuSO_4 .

Достоверность результатов. Включенные в диссертационную работу результаты получены с использованием общепринятых методов биохимии и молекулярной биологии на современном высокотехнологичном оборудовании. В работе представлены статистически достоверные данные, для анализа которых использовали ПО STATISTICA 10 для Windows 10, MS Excel. Основная часть результатов опубликована в рецензируемых российских и зарубежных журналах, доложена на конференциях международного и всероссийского уровня.

Теоретическая и практическая значимость работы. Описаны механизмы акклимации растений циннии и табака к действию CuSO_4 в длительном эксперименте за счет изменения антиоксидантного статуса растений, экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза фенольных соединений, модификации состава лигнина в тканях корня и побега растений. Эти данные существенно расширяют представления о системном взаимодействии разных механизмов защиты растений в условиях стресса, вызванного избытком ионов меди в среде. Результаты исследования могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических факультетов.

Положения, выносимые на защиту:

1. У растений табака и циннии при избытке сульфата меди в среде происходило утолщение корня в зоне проведения и усиление лигнификации тканей, рост активности пероксидаз III класса, увеличение уровня транскриптов гена *PRX* в тканях корня и стебля циннии.
2. Продолжительное действие сульфата меди приводило к увеличению относительного уровня транскриптов генов *PAL*, *C4H*, *4CL*, *CAD* в стебле циннии, что, возможно, способствовало увеличению содержания фенолов, которые расходовались на лигнификацию и гашение активных форм кислорода.

Личный вклад соискателя заключался в планировании и проведении эксперимента, статистической обработке полученных результатов, непосредственном участии в обсуждении материалов. Представленные в работе данные получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Фамилии и имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы. Результаты диссертации были представлены в виде стендовых и устных докладов на научных конференциях: «Биология – наука XXI века: 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых» (Пушино, 2019); «Биосистемы: организация, поведение, управление: 72-й Всероссийская с международным участием школа конференция молодых ученых» (Нижний Новгород, 2019); Всероссийская конференция с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология» (Тула, 2019); «II Международная научно-практическая конференция Современные подходы и методы защиты растений» (Екатеринбург, 2020); «The 1st International Electronic Conference on Plant Science» (онлайн, Италия, Англия, 2020); «Биосистемы: организация, поведение, управление: 72-й Всероссийская с международным участием школа конференция молодых ученых» (Нижний Новгород, 2021); III Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Екатеринбург, 2021); Всероссийская научная конференция с международным участием «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее» (Москва, 2021).

Публикации. Общее число публикаций автора – 15, в том числе, 5 статей (в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus – 4; 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК) и 10 тезисов докладов научных конференций.

Структура и объем диссертация. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 259 работы (из них 248 на иностранном языке). Работа изложена на 150 страницах, содержит 14 таблиц, 28 рисунков и 1 приложение.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.б.н., зав. кафедрой экспериментальной биологии и биотехнологий ИЕНиМ УрФУ Киселевой И.С. за помощь и всестороннюю поддержку в подготовке диссертационной работы; к.б.н., доценту Ермошину А.А. за консультации при проведении исследований; профессору, зав. лабораторией геномных исследований устойчивости растений к фитопатогенам Университета Внутренней Монголии, г. Хух-Хото (Китай) Вируянгану Хаде за предоставленную возможность проведения части молекулярно-генетических исследований. Также автор выражает признательность коллективу кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий ИЕНиМ УрФУ за поддержку и доброжелательность. Работа частично поддержана грантом РНФ № 22-24-00817, <https://rscf.ru/project/22-24-00817/>.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Рассмотрена роль меди как эссенциального микроэлемента и как стрессора. Охарактеризовано токсическое действие ионов меди в растениях, роль антиоксидантной системы растений в акклимации к их избытку в среде на биохимическом и анатомо-морфологическом уровне и влияние ионов меди на состав и структуру КС. Описана роль фенольных соединений и лигнина в формировании устойчивости растений к действию абиотических факторов, участие транскрипционных факторов, гормонов и ферментов в регуляции их биосинтеза.

Глава 2. Материалы и методы

Объекты исследования и условия культивирования. Объекты исследования – табак *Nicotiana tabacum* L. сорта Petite Havana линии SR1 и цинния *Zinnia elegans* Jacq. сорта Красная шапочка. В предварительном эксперименте семена проращивали в чашках Петри с водными растворами CuSO_4 (50–1000 μM). Контроль – вода.

В длительном эксперименте растения табака культивировали в смеси из перлита и вермикулита (1 : 1) на среде Кнопа с добавлением 100 или 300 μM CuSO_4 в течение 40 дней. Контроль – среда Кнопа.

Растения циннии в течение 20 дней культивировали в сосудах объемом 200 мл с почвенной смесью, состоящей из почвогрунта и кокосового субстрата (3 : 1) с добавлением водных растворов 100 или 200 μM CuSO_4 . Контрольные растения в течение всего эксперимента поливали дистиллированной водой. Растения культивировали при 23°C и фотопериоде свет / темнота – 16 / 8 часов.

Анатомо-морфологические параметры корня и побега измеряли на 40 день роста у растений табака, на 20 день у циннии. Анатомические характеристики корня и стебля на поперечных срезах, окрашенных солянокислым флороглюцином (Liljegen, 2010), определяли с помощью ПО SimagisMesoplant (ООО «СИАМС», Россия) для Windows 96 после визуализации с использованием светового микроскопа Meiji MT 4300L («MeijiTechno», Япония).

Содержание меди в субстратах (валовая и доступная формы) и растительных тканях измеряли методом атомно-эмиссионной спектроскопии (ICP-AES, iCAP 6500 Duo, ThermoFisher, США) после «мокрого» озоления материала.

Количество **пероксида водорода** определяли спектрофотометрически по Bellincampi (2000), интенсивность **перекисного окисления липидов (ПОЛ)** – по образованию ТБК-реагирующих продуктов (ТБК-РП) по Uchiyama и др. (1978). **Содержание фенольных соединений** измеряли в спиртовом экстракте (80% этанол) с использованием реактива Фолина-Чокалтеу в пересчете на галловую кислоту (Денисенко и др., 2015). **Количество лигнина** определяли по методу Класона (Оболенская, 1965).

Активность ферментов оценивали в грубом экстракте (0,05 М Tris-HCl буфере, pH 7,0). Активность СОД определяли по Beauchamp и Fridovich (1971); бензидиновой пероксидазы (БПО) по Goldfischer и Essner (1969); гваяколовой пероксидазы (ГПО) и каталазы по Chance и Maehly (1955). Содержание белка определяли по Bradford (1976), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Все измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu», Япония).

Белковый электрофорез проводили в неденатурирующих условиях в 10% полиакриламидном геле. **Изоформы пероксидаз III класса** выявляли по модифицированному методу (Lee et al., 2007). После сканирования гелей фотографии обрабатывали в программе ImageJ для Windows 10.

Определение уровня транскриптов генов биосинтеза лигнина. Тотальную РНК выделяли из растительного материала с использованием тризола (TransGenBiotech, КНР), концентрацию РНК определяли спектрофотометрически (NanoDrop ND-1000, ThermoScientific, США). Для синтеза первой цепи кДНК использовали 100 нг тотальной РНК для каждого образца с праймерами Oligo(dT) 23VN и RandomHexamer, согласно инструкциям производителя (HiScript II 1st standart cDNA synthesis kit, Vasyme, КНР). Количество мРНК оценивали с помощью метода Quantitive real-time PCR в оптическом 96-луночном амплификаторе qTOWER 2.0 (AnalytikJena, Германия) с использованием TransStartTipGreen qPCR SuperMix (TransGenBiotech, КНР). Специфические праймеры для генов *PAL1* (номер доступа в NCBI: FM879196), *C4H* (FM880082), *4CL* (AU294519), *CAD* (FM881026), *PRX* (AB023959), *LAC* (AU286008), *MYB1* (FM880773), *MYB2* (FM881238), *ERF1* (FM879695), *ERF2* (FM879410), *18S rRNA* (AB089282) подбирали с помощью программы GeneRunner 4.0 (www.generunner.net/). Амплификацию проводили в стандартных условиях (1 цикл: 30 с при 94°C; 40 циклов:

5 с при 94°C, 15 с при 60°C и 10 с при 72°C; 5 с при 60°C). Уровень транскриптов определяли с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001). В качестве референсного гена использовали *18S rRNA*.

Статистическая обработка данных. Опыты повторяли трижды. Анализ биохимических и молекулярно-генетических показателей проводили не менее чем в 3 биологических и 5 аналитических повторностях, используя для расчётов достоверности различий *U*-критерий Манна-Уитни. Для обработки данных о всхожести семян использовали критерий Фишера, для морфо-анатомических параметров объем выборки составил не менее 30 измерений для каждой группы – для расчета достоверности использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные в работе представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Звездочкой обозначены статистически достоверные отличия.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Реакция растений табака на избыток сульфата меди в среде

Влияние сульфата меди на всхожесть семян. Внесение в среду 50–200 μM CuSO_4 стимулировало прорастание семян табака. При 300 μM всхожесть не изменялась, тогда как при действии 500 и 1000 μM снижалась.

Соотношение валовых и доступных форм меди в субстрате. Смесь перлита с вермикулитом эффективно связывала ионы меди. При внесении в субстрат растворов 100 и 300 μM CuSO_4 количество доступных форм меди не превышало 0,2% от ее валового содержания и составило, соответственно, 0,15 и 0,49 мг/кг.

Содержание меди в органах. Во всех вариантах опыта медь накапливалась преимущественно в тканях корня табака (*рис. 1*). Коэффициент транслокации (КТ) стебель/корень и лист/корень не превышал 0,5 – это позволяет отнести табак к растениям исключателям.

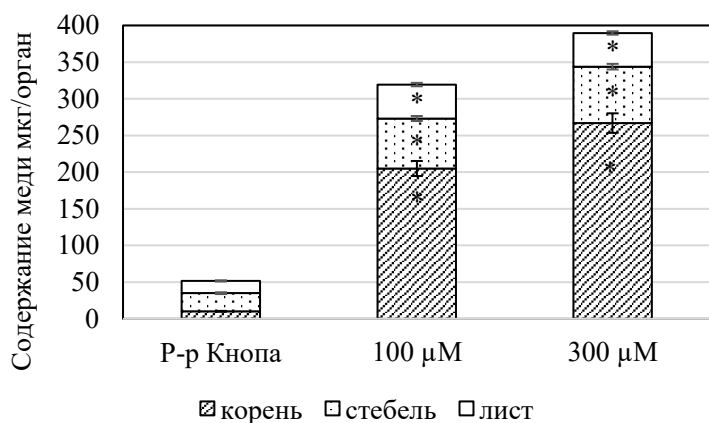


Рисунок 1. Содержание меди в органах табака при 40-дневной обработке субстрата растворами 100 μM и 300 μM CuSO_4

Влияние сульфата меди на анатомо-морфологические параметры. При добавлении в среду раствора сульфата меди в концентрации 100 μM наблюдали стимулирование роста стебля и листьев, а 300 μM – подавление роста корня в длину (*табл. 1*). В обоих вариантах опыта в сравнении с контролем происходило утолщение корня и стебля (*табл. 1*) за счет увеличения диаметра стелы и коры (*рис. 2*). При увеличении содержания меди в тканях (*рис. 1*) происходило неравномерное отложение лигнина в КС эндодермы, рост количества механических элементов и сосудов ксилемы в проводящем пучке (*рис. 3*). Эта реакция является неспецифической на действие ТМ (Abdelgawad et al., 2020).

Таблица 1. Масса и морфологические характеристики растений табака (возраст 40 дней) в условиях длительной обработки субстрата 100 μM и 300 μM CuSO_4

Вариант	Сырая масса растения, г	Высота стебля, см	Длина главного корня, см	Диаметр корня, μm (зона проведения)	Диаметр стебля, μm (4-ое междоузлие)	Площадь листа, cm^2 (5 ярус)
Контроль (р-р Кнопка)	$3,7 \pm 0,4$	$11,1 \pm 0,4$	$10,5 \pm 0,5$	1146 ± 58	2598 ± 13	$61,0 \pm 2,2$
100 μM CuSO_4	$4,2 \pm 0,6$	$12,9 \pm 0,5^*$	$9,6 \pm 0,8$	$1593 \pm 45^*$	$2609 \pm 29^*$	$68,9 \pm 2,4^*$
300 μM CuSO_4	$3,3 \pm 0,5$	$12,0 \pm 0,6$	$7,3 \pm 0,8^*$	$1764 \pm 64^*$	$2787 \pm 24^*$	$57,0 \pm 2,3$

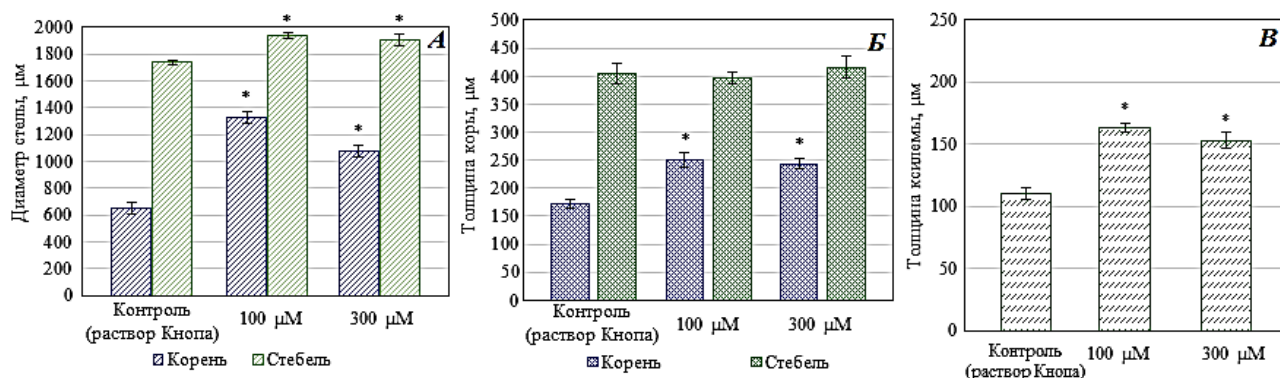


Рисунок 2. Анатомо-морфологические параметры корня и стебля растений табака при длительной обработке растворами 100 и 300 μM CuSO_4 : **A** – диаметр стелы, **B** – толщина коры, **V** – толщина ксилемы в стебле.

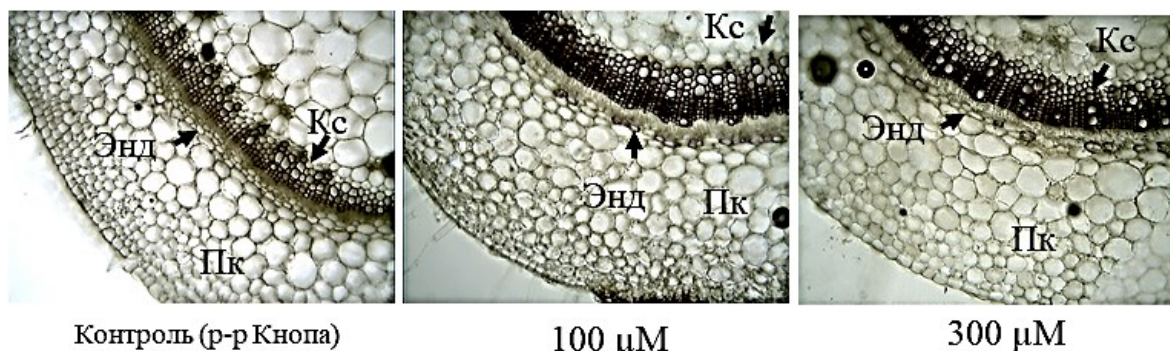


Рисунок 3. Лигнификация стебля растений табака при 40-дневной обработке 100 и 300 μM CuSO_4 (увеличение $\times 28$). Энд – эндодерма, Пк – первичная кора, Кс – ксилема.

Содержание фенольных соединений. Накопление меди в растениях табака при длительной обработке субстрата 100 и 300 μM CuSO_4 (рис. 1) сопровождалось изменением содержания фенольных соединений в органах растения (табл. 2). В корне, несмотря на увеличение содержания меди в тканях, содержание фенольных соединений уменьшалось в варианте с обработкой 100 μM CuSO_4 и не изменялось в варианте с обработкой 300 μM CuSO_4 . Содержание фенольных соединений в стебле росло, в листьях их концентрация увеличилась в варианте с обработкой субстрата раствором 300 μM CuSO_4 .

Таблица 2. Содержание фенольных соединений (мг/г сухой массы) в тканях табака в условиях длительной обработки субстрата CuSO_4

Орган	Контроль (р-р Кнопа)	100 μM CuSO_4	300 μM CuSO_4
Корень	28,91 \pm 0,6	23,94 \pm 0,99*	28,31 \pm 1,12
Стебель	8,76 \pm 0,53	11,94 \pm 0,43*	12,34 \pm 1,07*
Лист	28,18 \pm 1,57	25,41 \pm 1,86	34,38 \pm 1,74*

Изменение содержания фенольных соединений может быть следствием их синтеза в ФП пути, или при участии хинон-редуктазы, а также их использованием как антиоксидантов и субстратов для лигнификации КС (Michalak, 2006).

Содержание H_2O_2 и продуктов ПОЛ при действии меди. При длительной обработке субстрата раствором 100 μM CuSO_4 содержание пероксида водорода и продуктов ПОЛ в корнях и побеге уменьшалось относительно контроля (*табл. 3*), а в случае с 300 μM происходило их увеличение.

Таблица 3. Количество H_2O_2 и ТБК-РП в тканях табака на 40 день роста в условиях длительной обработки субстрата сульфатом меди

Вариант	H_2O_2 , $\mu\text{M}/\text{г}$ сухой массы			ТБК-РП, $\mu\text{M}/\text{г}$ сухой массы		
	корень	стебель	лист	корень	стебель	лист
Контроль (р-р Кнопа)	7,7 \pm 0,2	8,5 \pm 0,3	37,2 \pm 0,8	42,4 \pm 1,6	22,3 \pm 1,0	28,7 \pm 2,3
100 μM CuSO_4	5,4 \pm 0,2*	5,4 \pm 0,3*	12,0 \pm 0,2*	35,5 \pm 1,6*	23,8 \pm 0,6	25,8 \pm 1,5
300 μM CuSO_4	12,3 \pm 0,3*	9,5 \pm 1,6	43,2 \pm 0,6*	49,9 \pm 0,5*	33,6 \pm 1,7*	59,9 \pm 2,7*

Активность антиоксидантных ферментов. Длительное внесение в субстрат 100 μM CuSO_4 мало изменяло активность СОД, тогда как добавление 300 μM CuSO_4 вызывало рост ее активности во всех органах растений (*рис. 4 А*), что сопровождалось увеличением концентрации продукта реакции – пероксида водорода (*табл. 3*). Эффект был сильнее выражен в корнях и стеблях, чем в листьях.

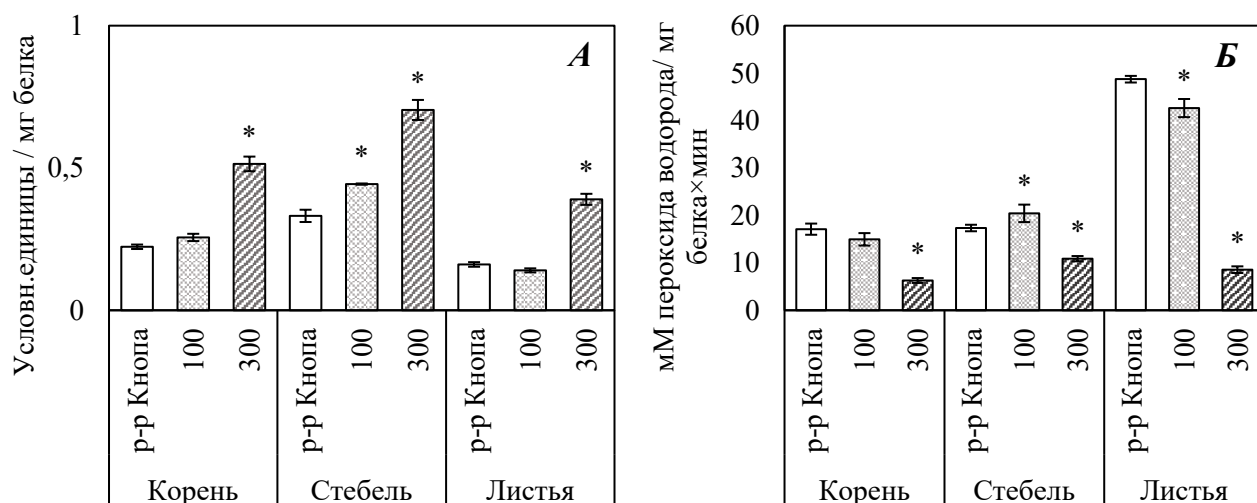


Рисунок 4. Активность СОД (*А*) и каталазы (*Б*) в тканях табака в условиях длительной обработки субстрата растворами 100 и 300 μM CuSO_4

И в условиях опыта, и в контрольной группе растений активность каталазы (*рис. 4 Б*) была максимальной в листьях по сравнению с другими органами, что можно объяснить генерацией пероксида водорода в ходе фотосинтеза и фотодыхания и необходимостью их утилизации. При внесении в субстрат раствора 300 μM CuSO_4 активность каталазы снижалась.

В ответ на увеличение содержания меди в тканях корня происходило усиление активности ГПО (*рис.5 А*). Тотальная активность БПО была более высокой в корне в сравнении с другими органами (*рис.5 Б*). Это может быть связано с ролью фермента в лигнификации ксилемы и механических тканей в корне, а также утилизации пероксида водорода, образующегося в корне при накоплении ионов меди. В стебле и листьях активность фермента возрастала при избытке меди в среде в сравнении с контролем.

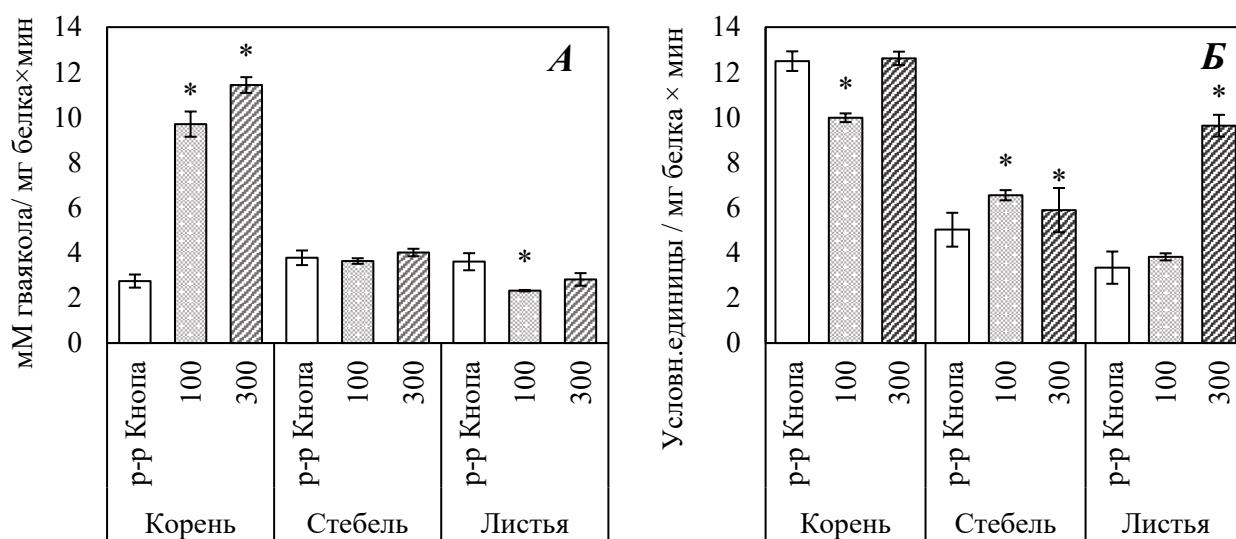


Рисунок 5. Активность ГПО (А) и БПО (Б) в тканях табака в условиях длительной обработки субстрата растворами 100 и 300 μM CuSO_4 .

В разных органах табака выявлены общие (A_1 и A_3) и специфические изоформы пероксидаз III класса (*рис. 6*). В корне обнаружены специфические изоформы $A_5 - A_7$.

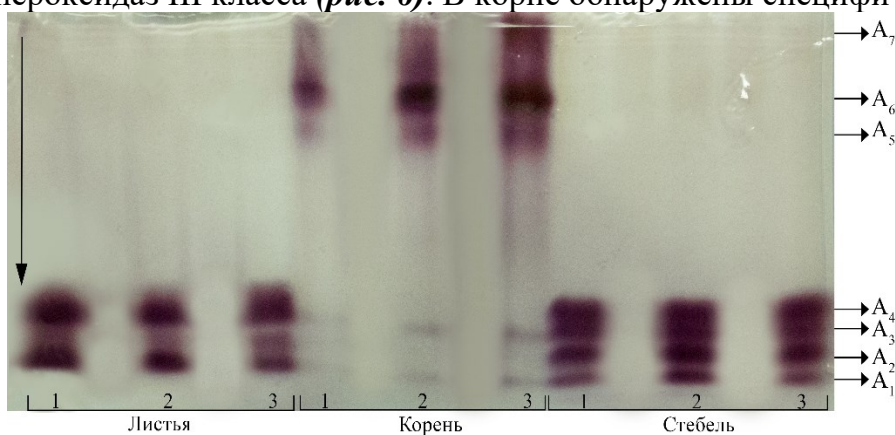


Рисунок 6. Изоформы пероксидаз III класса в тканях табака. Стрелкой указано направление движения тока; 1 – контроль (раствор Кнопа); 2 – обработка 100 μM CuSO_4 ; 3 – обработка 300 μM CuSO_4 .

Увеличение активности изоформ A_5 и A_6 наблюдали во всех вариантах опыта в сравнении с контролем. Увеличение тотальной активности ГПО связано с большей активностью изоформ A_1 , A_3 и A_5 , появлением изоформ A_7 в варианте с длительным действием 300 μM сульфата меди в среде. В тканях стебля показан сопоставимый с контрольными растениями уровень активности изоформ пероксидаз во всех вариантах опыта. Уникальной изоформой являлась A_4 .

3.2. Реакция растений циннии на избыток сульфата меди в среде

Влияние сульфата меди на всхожесть семян. Всхожесть семян циннии в вариантах с обработкой раствором 25 и 50 μM CuSO_4 не изменялась, тогда как при действии 100 и 200 μM она снижалась на 11%, а при 500 и 1000 μM – более чем на половину.

Соотношение валовых и доступных форм меди в субстрате. Компоненты почвосмеси связывали ионы меди: количество подвижных форм меди после внесения 100 и 200 μM CuSO_4 составило 0,56% от ее валового содержания (0,65 и 1,12 мг/кг субстрата соответственно).

Содержание меди в органах циннии. После 20 дней обработки депонирование меди происходило в основном в корнях, в побег они мало транспортировались (*табл. 5*). КТ стебель/корень и лист/корень не превышал 0,7 – это позволяет считать циннию растением-исключателем меди.

Таблица 5. Содержание меди в органах циннии, КТ металла при 20-дневной обработке субстрата растворами CuSO_4

Вариант	Содержание меди, мкг/г сухой массы			КТ	
	корень	стебель	лист	стебель/корень	лист/корень
Контроль (вода)	9,80 ± 0,49	11,36 ± 0,56	14,01 ± 0,30	1,16	1,42
100 μM CuSO_4	22,12 ± 1,11*	12,32 ± 0,62	14,56 ± 0,61	0,56	0,63
200 μM CuSO_4	26,32 ± 1,32*	12,04 ± 0,60	17,55 ± 0,46*	0,46	0,67

Влияние сульфата меди на анатомо-морфологические признаки. Обработка субстрата растворами 100 и 200 μM CuSO_4 приводила к увеличению высоты растений циннии в сравнении с контролем (5,7±0,2 см) – 7,8±0,3 см и 7,6±0,3 см, соответственно. Толщина корня не изменилась, но происходило увеличение диаметра стелы в зоне проведения (*табл. 6*). Толщина стебля возрастала (2-е междоузлие от семядольных листьев) за счет утолщения коры и стелы. Уменьшение длины главного корня и его утолщение – неспецифические реакции растений на действие ионов ТМ (Elleuch et al., 2013; Ермошин и др., 2013; Abdelgawad et al., 2020).

Таблица 6. Анатомические параметры корня и стебля циннии (единица измерения – μm) при 20-дневной обработке субстрата растворами CuSO_4

Вариант	Корень			Стебель			
	Диаметр	Толщина коры	Толщина стелы	Диаметр	Толщина коры	Толщина стелы	Диаметр пучка
Контроль (вода)	1244 ± 14	253 ± 4	768 ± 9	1076 ± 11	125 ± 4	792 ± 11	55 ± 1
100 μM CuSO_4	1158 ± 16	224 ± 5	793 ± 13	1152 ± 16*	142 ± 5*	891 ± 15*	54 ± 1
200 μM CuSO_4	1251 ± 21	251 ± 6	782 ± 19	1197 ± 17*	132 ± 3*	951 ± 21*	54 ± 2

В условиях обработки субстрата CuSO_4 увеличивалось содержание лигнина Класона (*рис. 7*) в корне (для варианта с обработкой 200 μM CuSO_4) и стебле циннии в сравнении с контрольным вариантом. Усиление лигнификации корня соотносится с барьерной функцией этого органа. В стеблях циннии в варианте с обработкой субстрата раствором 100 μM CuSO_4 общее содержание лигнина росло в основном за счет увеличения количества лигнина Класона.

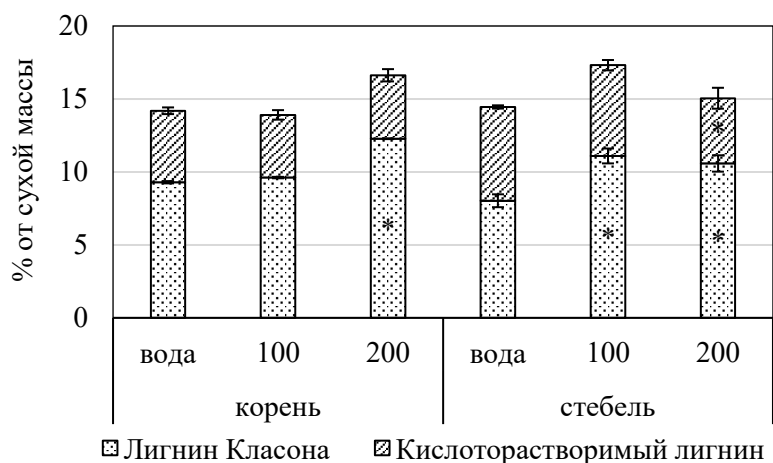


Рисунок 7. Содержание лигнина (% от сухой массы) в условиях длительной обработки субстрата растворами 100 и 200 μM CuSO_4 в корнях и стеблях растений циннии

В варианте с обработкой субстрата раствором 200 μM CuSO_4 количество кислоторасторимого лигнина снижалось, поэтому, суммарное содержание лигнина не изменялось по сравнению с контролем.

Содержание H_2O_2 и продуктов ПОЛ при действии меди. У циннии на 20 день эксперимента в опытных вариантах количество H_2O_2 в корнях и листьях увеличилось в сравнении с контрольными (рис. 8 А). В стебле его содержание достоверно снизилось относительно контроля. В случае обработки субстрата раствором 200 μM CuSO_4 во всех органах происходило усиление ПОЛ (рис. 8 Б)

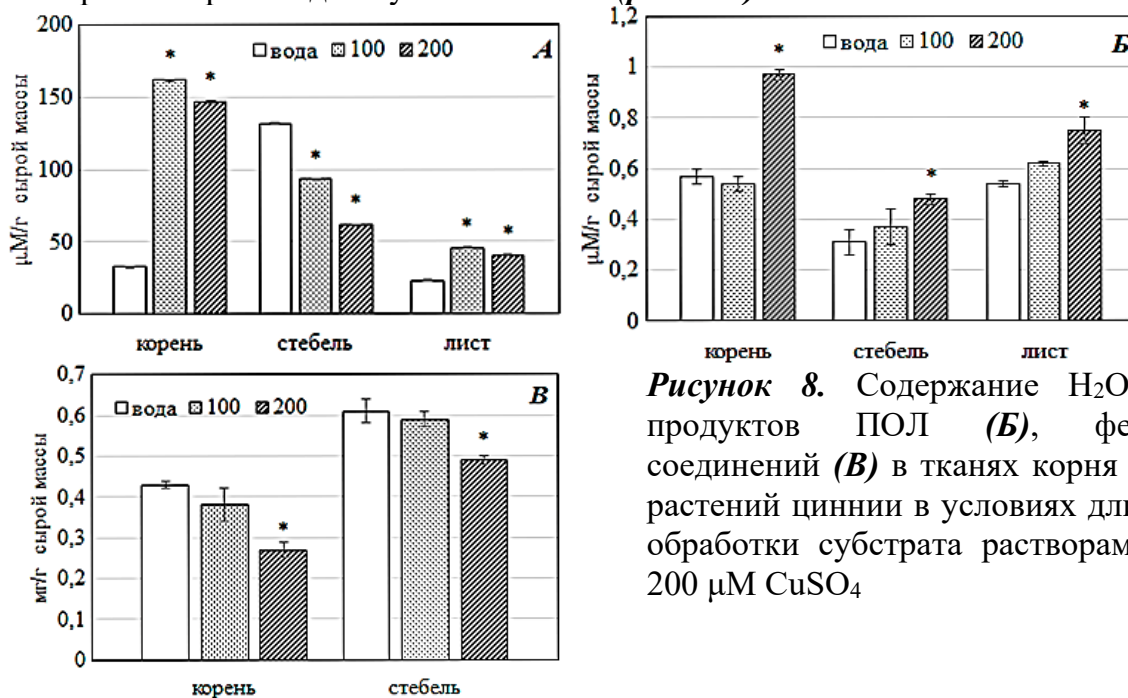


Рисунок 8. Содержание H_2O_2 (А) и продуктов ПОЛ (Б), фенольных соединений (В) в тканях корня и побега растений циннии в условиях длительной обработки субстрата растворами 100 и 200 μM CuSO_4

Содержание фенольных соединений. В корнях и стебле циннии при обработке субстрата 200 μM CuSO_4 содержание фенольных соединений уменьшалось в сравнении с контролем (рис. 8 В). Вероятно, такие изменения являются следствием множественных механизмов регуляции образования и использования фенольных соединений, в том числе, как антиоксидантов и субстратов для синтеза лигнина за счет изменения активности ферментов ФП, пероксидаз III класса, лакказ и полифенолоксидаз в условиях действия стрессовых факторов (Herrigetal., 2002). В наших опытах увеличение количества лигнина Класона в корне и стебле циннии коррелировало со снижением содержания фенольных соединений ($r = -0.83$).

Активность антиоксидантных ферментов. Внесение растворов CuSO_4 в субстрат приводило к снижению активности СОД в тканях корня и стебля (рис. 9А). Такая реакция может являться результатом инактивации фермента при связывании Cu^{2+} с сульфгидрильными группами аминокислот или продуктом реакции дисмутации – H_2O_2 , а также снижения активности отдельных изоформ этого фермента (Chen et al, 2015; Abdelgawad et al, 2020; Gutiérrez-Martínez et al., 2020).

Активность каталазы в условиях стресса мало менялась в тканях корня, не изменялась в стебле, возрастала в листьях в варианте с обработкой 200 μM CuSO_4 в сравнении с контрольным вариантом (рис. 9Б). Высокая тотальная активность каталазы в надземных органах циннии по сравнению с тканями корня может быть связана с участием этого фермента в нейтрализации H_2O_2 , образующегося в световой фазе фотосинтеза и при фотодыхании.

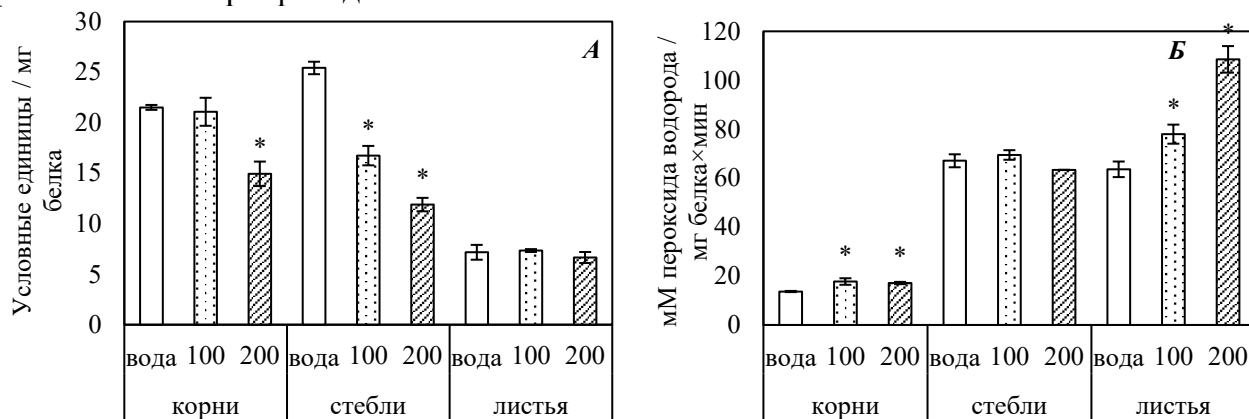


Рисунок 9. Активность СОД (А) и каталазы (Б) в тканях корня, стебля и листьев циннии в условиях обработки субстрата растворами CuSO_4 на 20 день роста

Корни циннии характеризовались высокой активностью БПО в сравнении с листьями и стеблем. При стрессе увеличение ее активности происходило во всех органах (рис. 10 А). По данным гистохимического анализа этот фермент локализован в эпидерме и эндодерме, формирующихся сосудах ксилемы корня и стебля (данные представлены в диссертации).

Активность ГПО (рис. 10 Б) при стрессе возрастала в 4,5 раза в тканях корня, тогда как в стебле и листьях она мало изменялась относительно контроля. Фермент был локализован в ксилеме корня и стебля, склеренхиме стебля (данные представлены в диссертации).

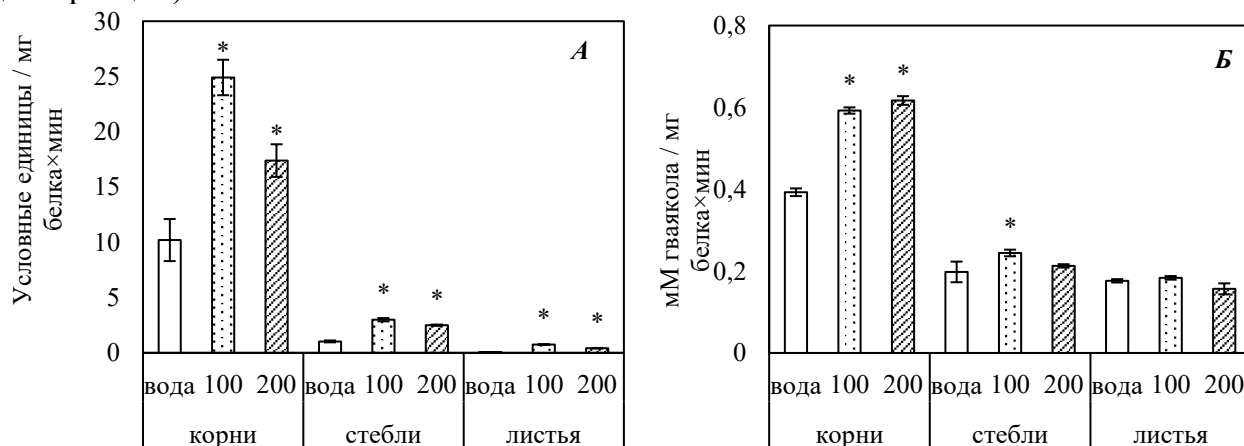


Рисунок 10. Активность БПО (А) и ГПО (Б) в тканях корня, стебля и листьев циннии в условиях обработки субстрата растворами CuSO_4 на 20 день роста

Мы предполагаем, что усиление активности пероксидаз III класса в корнях при стрессе может быть связано с увеличением активности ранее образованных изоформ или усилением их синтеза *de novo*, что могло приводить к снижению количества пероксида водорода и увеличению, соответственно, доли фенольных соединений, используемых в биосинтезе лигнина, а не на гашение АФК. Таким образом, совместная работа антиоксидантных ферментов обеспечила поддержание роста растений циннии в условиях обработки субстрата CuSO₄.

Экспрессия генов, кодирующих ферменты и ТФ, участвующие в биосинтезе лигнина. В корнях и стеблях циннии было определено относительное содержание транскриптов некоторых генов путей биосинтеза фенольных соединений и лигнина. В условиях избытка сульфата меди в среде уровень транскриптов гена *PAL*, *C4H*, *PRX* и *LAC* мало изменялся в корне, но увеличивался в стебле при выращивании растений на субстрате, обработанном раствором 100 μM CuSO₄ (**табл. 7**). Рост относительного содержания транскриптов гена *CAD* был сильнее выражен в стебле по сравнению с корнем. В варианте с 200 μM CuSO₄ уровень транскриптов гена *4CL* в 7–8 раз возрастал и в стебле, и в корне, а относительное содержание транскриптов генов *CAD* и *PRX* в стебле возрастало почти в 2,5 раза в сравнении с контролем.

Таблица 7. Относительное содержание транскриптов генов ФП пути, синтеза лигнина и ТФ в корнях и в стебле циннии на 20 день роста в условиях обработки субстрата растворами CuSO₄

Вариант	<i>PAL</i>	<i>C4H</i>	<i>4CL</i>	<i>CAD</i>	<i>PRX</i>	<i>LAC</i>	<i>ERF1</i>	<i>ERF2</i>	<i>MYB1</i>	<i>MYB2</i>
<i>Корень</i>										
Контроль (вода)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100 μM CuSO ₄	0,82	1,04	1,14	2,23	1,19	0,56	0,34	0,72	0,92	0,59
200 μM CuSO ₄	0,65	1,43	8,87	1,63	1,81	0,74	0,54	0,46	1,34	0,67
<i>Стебель</i>										
Контроль (вода)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100 μM CuSO ₄	9,84	8,34	1,70	17,3	28,05	7,59	14,27	1,73	10,48	5,17
200 μM CuSO ₄	1,78	0,74	7,62	2,45	2,46	0,77	1,26	0,13	0,65	0,57

Усиление экспрессии гена пероксидазы (*PRX*) у циннии при стрессе, вероятно, приводило к изменению состава лигнина. Количество лигнина Класона положительно коррелировало с уровнем экспрессии этого гена в тканях стебля ($r = +0,81$). Рост количества транскриптов генов *PAL* и *CAD* положительно коррелировал с общим содержанием лигнина в стебле ($r = +0,73$).

В литературе обсуждается роль ТФ семейства ERF и MYB в регуляции ФП. Их экспрессия может активироваться в ответ на увеличение этилена, пероксида водорода при действии стрессоров (Li et al., 2018; Wessels 2019). В корнях опытных растений в сравнении с контрольными количество транскриптов генов *ERF1*, *ERF2* и *MYB2* несколько снижалось, а *MYB1* практически не изменилось, тогда как в стебле в варианте со 100 μM CuSO₄ уровень транскриптов генов *ERF1*, *MYB1* и *MYB2* возрастал. В опыте с 200 μM CuSO₄ относительное содержание транскриптов генов *ERF2*, *MYB1* и *MYB2* мало изменялось в сравнении с контролем. Корреляционный анализ показал,

что содержание транскриптов генов *ERF1*, *MYB2* положительно коррелировало с содержанием транскриптов генов *C4H* ($r= +0.94$ и $+0.90$) и *LAC* ($r= +0.92$ и $+0.89$), что предполагает вероятное участие этих ТФ в регуляции экспрессии генов *C4H* и *LAC*.

Усиление экспрессии генов биосинтеза фенолпропаноидов (*4CL*, *CAD*) и лигнина (*PRX* и *LAC*) при стрессе, вероятно, обеспечивает рост содержания лигнина в корне и стебле. Увеличение экспрессии гена *PRX* и ферментативной активности пероксидаз III класса также могло привести к усилению лигнификации КС корня циннии, что обусловило снижение содержания фенольных соединений в корне при стрессе. Усиление лигнификации КС могло способствовать связыванию ионов меди и ограничению их транспорта в надземную часть растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что при добавлении в субстрат растворов сульфата меди в течение продолжительного периода (20 и 40 дней) значительная часть меди находилась в связанном состоянии. Несмотря на низкую доступность ионов меди в субстрате, они накапливались в тканях корня табака и циннии, и в меньшей степени транспортировались в побег. В этих условиях в корнях и побегах происходило увеличение количества таких маркеров стресса как H_2O_2 и ПОЛ.

Вызванное стрессом повышение активности СОД и пероксидаз III класса способствовало поддержанию роста корня и побега при обработке субстратов растворами $100 \mu M$ и $200 \mu M$ $CuSO_4$, но оказалось недостаточным для нормального роста растений табака при обработке $300 \mu M$ $CuSO_4$. Увеличение содержания меди в листьях также приводило к окислительному стрессу и усилению активности каталазы и пероксидаз в них.

Одной из реакций циннии и табака на увеличение содержания меди являлось утолщение корня и стебля и усиление лигнификации тканей, что могло приводить к частичной иммобилизации меди в КС и ограничению ее транспорта по растению. Усиление экспрессии генов ФП – *PAL*, *C4H*, *4CL*, *CAD*, предположительно, приводило к увеличению содержания фенольных соединений в тканях корня и стебля, которые расходовались на гашение активных форм кислорода и синтез лигнина. Усиление экспрессии гена *PRX* и активности пероксидаз способствовало лигнификации КС. Общая схема предполагаемых эффектов представлена на рисунке 11.



Рисунок 11. Предполагаемые эффекты действия сульфата меди ($100\text{--}300 \mu M$ в среде) на физиолого-биохимические и анатомо-морфологические характеристики растений

ВЫВОДЫ

1. Показана способность субстратов удерживать ионы меди при их длительной обработке растворами CuSO_4 . Содержание доступных форм меди в среде не превышало 0,2% от ее валового содержания в случае использования смеси перлита и вермикулита и 0,56% – почвосмеси.

2. Длительная обработка субстратов 100 μM сульфатом меди приводила к стимулированию роста табака и циннии: увеличивалась их высота, биомасса, площадь листа. При обработке субстратов как низкими (100 μM), так и высокими дозами (300 μM для табака и 200 μM для циннии) происходило утолщение корня и стебля и усиливалась лигнификация тканей.

3. Увеличение содержания меди в органах растений табака и циннии приводило к росту количества пероксида водорода и продуктов ПОЛ в них, что свидетельствует об развитии окислительного стресса при выращивании растений на субстратах с добавлением сульфата меди.

4. В условиях стресса в сравнении с контролем изменялась активность ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталазы и пероксидаз III класса). Увеличение тотальной активности пероксидаз происходило за счет изменения активности существующих изоформ.

5. Содержание фенолов в тканях различалось в зависимости от органа растения и внесенной в среду дозы сульфата меди. Оно, по-видимому, определялось уровнем транскриптов генов, кодирующих ферменты биосинтеза фенолов (*PAL*, *C4H*, *4CL* и *CAD*), активностью пероксидаз и использованием фенолов как субстратов для лигнификации КС.

6. Увеличение относительного содержания транскриптов генов *PAL*, *CAD* и *PRX* при стрессе положительно коррелировало с количеством лигнина в тканях стебля циннии.

7. Относительное содержание транскриптов *ERF1* и *MYB2* коррелировало с содержанием транскриптов генов *C4H* ($r = +0.94$ и $+0.90$) и *LAC* ($r = +0.92$ и $+0.89$) в стебле, что предполагает участие этих ТФ в регуляции экспрессии генов ФП и синтеза лигнина в условиях стресса, вызванного медью.

Публикации по теме диссертации:

Статьи в журнале, индексируемом в базах данных

Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Киселева И.С. (2019) Предсказание функций некоторых пероксидаз *Arabidopsis thaliana* L. на основе биоинформатического поиска. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **23(5)**, 615–623 (*Web of Science, Scopus, ВАК, ядро РИНЦ*).

Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Плотников Д.С., Киселева И.С. (2020) Восстановление растений табака после обработки ионами меди. *Вестник Пермского университета, серия Биология*, **4**, 344–351 (*ВАК*).

Tugbaeva A.S., Ermoshin A.A., Plotnikov D.S., Kiseleva I.S. (2021) Activity of cell wall-bound and cytosolic peroxidases under the aftereffect of copper ions in *Nicotiana tabacum* plants. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, **14(3)**, 318–327. (*Scopus, ВАК, ядро РИНЦ*).

Plotnikov D.S., Tugbaeva A.S., Ermoshin A.A., Kiseleva I.S. (2021) Response reactions of *Zinnia elegans* seedlings to the impact of different copper ions concentrations. *AIP Conference Proceedings*, **2388**, 030034 (*Web of Science, Scopus, ядро РИНЦ*).

Tugbaeva A.S., Plotnikov D.S., Ermoshin A.A., Wuriyan H., Kiseleva I.S. (2021) Recovery of growth in *Zinnia elegans* after copper stress. *AIP Conference Proceedings*, **2388**, 020037 (*Web of Science, Scopus, ядро РИНЦ*).

Tugbaeva A., Ermoshin A., Plotnikov D., Wuriyangan H., Kiseleva I. (2021) Role of class III peroxidases in stem lignification of *Zinnia elegans* Jacq. *Biol. Life Sci. Forum*, 4, 22. <https://doi.org/10.3390/IECPS2020-08847>

Материалы и тезисы докладов конференций

- 1) **Тугбаева А.С., Плотников Д.С., Ермошин А.А., Киселева И.С.** (2019) Влияние ионов меди на рост листа и содержание фотосинтетических пигментов *Zinnia elegans*. *Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Экотоксикология – 2019»*. Тула: Издательство ТулГУ, с. 187–189.
- 2) **Тугбаева А.С., Ермошин А.А.** (2019) Ионы меди влияют на активность антиоксидантных ферментов, рост и лигнификацию растений *Zinnia elegans* Jacq. *Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление»*. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, с. 222.
- 3) **Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Киселева И.С.** (2019) Влияние ионов меди на рост и формирование клеточной стенки у растений *Zinnia elegans* Jacq. *Материалы 23 международной Пушчинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»*. Пушкино: Пушчинский научный центр, с. 279.
- 4) **Дурницына С.А., Тугбаева А.С., Киселева И.С.** (2020) Структура фотосинтетического аппарата растений циннии в условиях стресса, вызванного ионами меди. *Тезисы докладов 73 Всероссийская с международным участием школа конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление»*. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, с. 67.
- 5) **Плотников Д.С., Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Киселева И.С.** (2020) Ответные реакции проростков *Zinnia elegans* на действие разных концентраций ионов меди. *Материалы II Международной научно-практической конференции «Современные подходы и методы защиты растений»*. Екатеринбург: Издательство АМБ, с. 160–161.
- 6) **Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Плотников Д.С., Вируянган Х., Киселева И.С.** (2020) Восстановление роста *Zinnia elegans* после Cu^{2+} -стресса. *Материалы II Международной научно-практической конференции «Современные подходы и методы защиты растений»*. Екатеринбург: Издательство АМБ, с. 170–171.
- 7) **Котлячкова М.А., Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Киселева И.С.** (2021) Изменение уровня чувствительности листьев к ионам меди у стрессированных и восстановленных после длительного медного стресса растений табака. *Тезисы докладов 73 Всероссийская с международным участием школа конференция молодых ученых, посвященной памяти проф. А.П. Веселова С.* «Биосистемы: организация, поведение, управление». Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, с. 121.
- 8) **Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Киселева И.С., Вируянган Х.** (2021) Активность ассоциированных с клеточной стенкой и цитозольных пероксидаз в условиях последствия ионов меди в растениях *Nicotiana tabacum*. *Материалы докладов III Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений»*. Екатеринбург: Издательство АМБ, с. 144–145.
- 9) **Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Киселева И.С.** (2021) Физиолого-биохимические реакции растений *Nicotiana tabacum* на длительную обработку ионами Cu^{2+} . *Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее»*. Москва, с. 241.