

На правах рукописи



Радиокина Наталия Львовна

«Функционирование компонентов антиоксидантной системы дикорастущих видов растений при кратковременном действии стрессоров»

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН
Кузнецов Владимир Васильевич

Официальные оппоненты: **Иванов Борис Николаевич**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, г. Пущино; зав. лабораторией фотосинтетического электронного транспорта;

Таланова Вера Викторовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск, главный научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений;

Кошкин Евгений Иванович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственной академии им. К.А.Тимирязева, Москва, профессор кафедры физиологии растений факультета агрономии и биотехнологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород.

Защита диссертации состоится «20» октября 2015 года в 11:00 ч на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» (биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 977-80-18, www.ippras.ru, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru, ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Автореферат разослан « » июня 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Сохранение существующих на Земле экосистем - актуальная задача человечества в ближайшие десятилетия. Поскольку растения являются основными продуцентами в биоценозах, то ключевой проблемой современной физиологии растений остается исследование механизмов, позволяющих растению выживать и заканчивать онтогенетический цикл в условиях кратковременного или постоянного действия неблагоприятных факторов окружающей среды. К таким неблагоприятным факторам относят засоление, повышение содержания в почвах тяжелых металлов, подтопление и другие аналогичные изменения экологических условий, являющихся следствием природных явлений или деятельности человека. Это важное направление физиологии растений связано с именами отечественных и зарубежных ученых, в частности, Н. А. Максимова, Б. П. Строгонова, П. А. Генкеля, И. И. Туманова, Вл. В. Кузнецова, Н. И. Шевяковой, В. П. Холодовой, Ю. В. Балнокина, Т. И. Труновой, Н. Н. В. Selye, J.-K. Zhu, P. V. K. Kishor, D. Rodes.

В растении под действием одного или нескольких стресс-факторов, происходит индукция защитного ответа, который позволяет ему выживать и адаптироваться к изменившимся внешним условиям. Выживание растений предполагает протекание двух качественно различных этапов: быстрого стрессорного ответа (стресс-реакции) и долговременной (специализированной) адаптации. Эти два этапа выполняют различные биологические функции. Стадия стресс-реакции обеспечивает лишь кратковременную защиту за счет мобилизации или индукции систем быстрого ответа. Эти системы энергоемки и не специфичны. На стадии адаптации обычно формируются эффективные долговременные защитные механизмы (Кузнецов, 2009). Известен целый ряд специализированных механизмов, индуцируемых растением при действии определенного стрессора. Однако в последнее время накоплены многочисленные данные о том, что общим интегральным процессом, характеризующим негативное действие стрессоров различной природы, является усиление генерации активных форм кислорода (АФК) (Foyer and Noctor, 2000; Gechev, 2006, Полесская., 2007, Abogadallah, 2010; Poljsak, 2011; Poljsak and Milisav, 2012; Miura and Tada, 2014). Образование АФК нужно рассматривать как негативное последствие существования организмов в аэробной среде и этот процесс возник одновременно с появлением

фотосинтезирующих организмов. Повышенное образование АФК происходит в хлоропластах и митохондриях в том случае, когда акцептором электронов выступает кислород из-за истощенности пула других акцепторов электронов (например, НАДФ) (Gechev, 2006; Gill and Tuteja, 2010; Foyer and Noctor, 2011). Кроме того, источником АФК является фотодыхание, скорость которого контролируется соотношением CO_2/O_2 и температурой. Взаимодействие АФК с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами приводит к нарушению структуры и функции мембран, активности ферментов, мутагенезу и, в итоге, к остановке клеточного цикла и апоптозу (Bieza and Lois, 2001; Mittler, 2002; Hidema J., Kumagai., 2006; Hong et al., 2013). В ответ на усиление генерации АФК, как правило, наблюдается активация элементов антиоксидантной защитной системы. Появление и развитие у организмов антиоксидантной системы, позволяющей контролировать уровень АФК, происходило одновременно с появлением и развитием фотосинтезирующих организмов (Mittler, 2002; Zhu, 2002; Бараненко, 2006; Abogadallah, 2010; Foyer and Noctor, 2015). Антиоксидантная защитная система клетки, растения - множество взаимосвязанных окислительно-восстановительных реакций, в которых участвуют антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные метаболиты. В нормальных условиях и при ОС антиоксидантные ферменты, супероксиддисмутазы (СОД), различные пероксидазы (ПО), каталаза и ферменты аскорбат-глутатионового цикла, играют важную роль в поддержании определенного безопасного уровня АФК. В последнее время активно обсуждается вопрос о способности АФК выступать в качестве сигнальных молекул и регуляторов экспрессии генов, детерминирующих защитный ответ растения (Apel K., Hirt H., 2004; Mittler et.al., 2004). Такой уровень необходим для протекания ряда метаболических реакций в клетке и не вызывает повреждения биомолекул (Kliebenstein D.J. et al., 1998; Gechev, 2006, Abogadallah, 2010). Альтернативным защитным механизмом у растений является стресс-зависимое накопление низкомолекулярных органических антиоксидантов: аскорбиновой кислоты, α -токоферола, глутатиона, пролина, полиаминов (ПА), каротиноидов, антоцианов и других соединений. Таким образом, образование повышенного количества АФК опасно в том случае, когда происходит нарушение баланса между образованием АФК и их разрушением (Gechev et al., 2006, Полесская, 2007, Abogadallah, 2010; Poljsak, 2011; Poljsak and Milisav, 2012; Miura and Tada, 2014). Именно это нарушение и является негативным интегральным

процессом, получившим название окислительного стресса (ОС). В настоящее время изучение механизмов адаптации растений к действию абиотических стрессоров, в частности, к засолению и действию ультрафиолетового излучения, проводят с использованием контрастных по устойчивости модельных растений или трансгенных с измененной экспрессией генов, кодирующих антиоксидантные ферменты или ферменты биосинтеза или катаболизма низкомолекулярных антиоксидантов. Однако проблема сохранения биоразнообразия затрагивает значительно более широкий спектр дикорастущих видов растений. Дикорастущие растения, не подвергавшиеся направленной селекции, могут существенно отличаться от модельных по конститутивному или стресс-индуцируемому уровню известных адаптивных реакций. Именно на этот аспект указывал Н. Вавилов в своей монографии «Центры происхождения культурных растений» (Вавилов, 1926). Такие исследования дикорастущих видов, позволяющие расширить наши знания об общих закономерностях защитного ответа в стрессорных условиях, важны для разработки стратегии сохранения биоценозов. Следует отметить, что одни и те же виды дикорастущих растений могут быть представителями нескольких различных биоценозов. В настоящее время в экологической англоязычной и российской литературе наравне с термином «биоценоз» применяется термин «биом». Биом - это совокупность биоценозов климатического пояса. Пределы выживаемости дикорастущих растений, представляющих биомы климатических поясов, при меняющихся природных условиях, а также природа защитного ответа изучены явно недостаточно.

Другой важной проблемой при изучении защитного ответа растения являются регуляторные или компенсаторные механизмы внутри антиоксидантной системы растений в нормальных и стрессовых условиях. Поскольку антиоксидантная система – это целая сеть биохимических реакций, необходимость существования таких механизмов очевидна. Несмотря на обширную литературу, посвященную функционированию антиоксидантных ферментов (Бараненко, 2005; Poljsak, 2011; Poljsak and Milisav, 2012; Miura and Tada, 2014) и низкомолекулярных метболитов (Шевякова, Кузнецов, 1999; Galston et.al., 1997; Bouchereau et.al, 1999; Hong et al., 2000; Matysik et al., 2007; Кузнецов и др., 2007; Kaul et al., 2008; Krishnan et al., 2008; Verbruggen, Hermans, 2008; Шевякова и др., 2009), очень немного известно о таких регуляторных или компенсаторных механизмах внутри антиоксидантной системы. Более того, остается практически не изученным вопрос, как

функционируют антиоксидантные ферменты при изменениях в метаболизме низкомолекулярных веществ, например, пролина или полиаминов (ПА), и как изменяется в этих условиях окислительно-восстановительный гомеостаз клетки. Таким образом, целью предлагаемой работы являлось: выявление общих закономерностей функционирования компонентов антиоксидантной системы дикорастущих видов растений, принадлежащих к биомам двух климатических поясов, при кратковременном воздействии абиотических стрессоров различной природы и исследование характера отношений между низкомолекулярными органическими антиоксидантами и антиоксидантными ферментами.

Положения, выносимые на защиту.

1. Реализация защитного эффекта антиоксидантной системы при кратковременном действии стрессоров на дикорастущие виды растений, представляющих биомы двух климатических поясов, требует активации нескольких или многих антиоксидантных реакций. При этом дикорастущие растения, относящиеся к биомам двух климатических поясов и произрастающие в различных условиях обитания, не обнаруживают принципиальных различий в функционировании компонентов антиоксидантной системы.

2. Избирательность в активации конкретных биохимических реакций, обеспечивающих защиту от окислительного стресса, определяется прежде всего конститутивными особенностями вида растения, и дополнительно природой действующего стрессора.

3. Пролин и спермин вовлекаются в регуляцию функционирования антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных органических антиоксидантов.

Цель и основные задачи исследования. Цель данного исследования – выявление общих закономерностей функционирования компонентов антиоксидантной системы дикорастущих видов растений, принадлежащих к биомам двух климатических поясов, при кратковременном воздействии абиотических стрессоров различной природы и исследование характера отношений между низкомолекулярными органическими антиоксидантами и антиоксидантными ферментами.

Основные задачи исследования. В связи с поставленной целью выполнялись следующие задачи:

1. Для выявления различий в конститутивном уровне активности антиоксидантной системы, связанных с видовой принадлежностью, провести

сравнительный анализ активностей СОД, каталазы и свободной формы ПО, содержания пролина, ПА и других низкомолекулярных соединений в контрольных условиях у дикорастущих растений, представляющих биомы умеренного пояса (лес и степь), субтропического пояса (вечнозеленые жестколистные леса и кустарники).

2. Для выявления избирательности в функционировании компонентов антиоксидантной системы, зависящей от вида стрессора, провести сравнительный анализ изменений в активностях СОД, каталазы и свободной формы ПО, уровнях пролина и ПА, каротиноидов, антоцианов и флавоноидов у опытных растений при действии засоления и UV-B облучения.

3. Для выявления общих закономерностей в регуляции внутриклеточного уровня пролина при действии абиотических стрессоров (засоления, UV-B облучения, модуляторов окислительного стресса: параквата (PQ) и H_2O_2) провести сравнительный анализ экспрессии генов метаболизма пролина в растениях *Thellungiella salsuginea* (теллунгиелла солонцовая) в стрессорных условиях.

4. Для выявления общих закономерностей в регуляции внутриклеточного уровня ПА при действии абиотических стрессоров (засоления, UV-B облучения) провести сравнительный анализ экспрессии генов биосинтеза ПА у растений теллунгиеллы солонцовой и подорожника большого в стрессорных условиях.

5. Для выявления общих закономерностей в функционировании СОД при действии стрессоров различной природы (засоления, UV-B облучения и модуляторов окислительного стресса) исследовать изменения в спектре, активностях изоформ СОД и экспрессии генов, кодирующих изоформы СОД в растениях шалфея и теллунгиеллы солонцовой.

6. Для выявления способности пролина и спермина (Спм) участвовать в регуляции функционирования антиоксидантных ферментов исследовать изоферментный состав СОД, аскорбатпероксидазы (АП), а также экспрессию генов, кодирующих изоферменты, в растениях шалфея и теллунгиеллы солонцовой в нормальных условиях и при действии стрессоров в условиях экзогенного добавления пролина и Спм.

Научная новизна. Проведенные комплексные исследования с использованием растений, относящихся к биомам двух климатических поясов, впервые показали, что функционирование антиоксидантной системы является главным общим механизмом быстрого защитного ответа растений при кратковременном действии

засоления и UV-B облучения, а также при их последовательном действии. Для эффективного защитного действия антиоксидантной системы не достаточно активации одной из реакций детоксикации активных форм кислорода, требуется функционирование как антиоксидантных ферментов, так и низкомолекулярных метаболитов. При этом установлено, что активация конкретной биохимической реакции, входящей в сеть антиоксидантной системы и обеспечивающей защитный ответ растения, определяется видом растения и интенсивностью и природой действующего фактора. Это проиллюстрировано обнаруженными реципрокными отношениями между уровнем пролина и активностью СОД, действующими в растениях, как в нормальных условиях, так и при действии абиотических стрессоров, и тем, что при засолении или UV-B облучении избирательно активировались или биосинтез полиаминов, или пролина, или антоцианов. Кроме того, показано, что высоким конститутивным уровнем пролина обладают как растения – гликофиты, например, василистник и чернушка, так и устойчивые к засолению растения, например, теллунгиелла солонцовая. Функционирование одной конкретной биохимической защитной реакции не является достаточным условием для выживания растения даже при кратковременном действии стрессора. Впервые установлено, что пролин и Спм регулируют активность, изоферментный состав ключевых антиоксидантных ферментов СОД, ПО, каталазы и АП как в нормальных, так и в стрессорных условиях у растений шалфея и теллунгиеллы солонцовой, возможно опосредовано через регуляцию собственного метаболизма. У растений шалфея и теллунгиеллы солонцовой, различающихся по конститутивному уровню пролина, последний принимает участие в регуляции функционирования антиоксидантных ферментов при действии UV-B облучения, H_2O_2 и PQ. Впервые показано, что участие пролина в детоксикации активных форм кислорода сопряжено с его окислением до оксипролина. В растениях теллунгиеллы солонцовой в условиях окислительного стресса, содержание оксипролина увеличивается в 2 раза.

Научно-практическое значение работы. Полученные в работе данные о функционировании антиоксидантной системы у дикорастущих растениях при действии стрессоров позволяют считать ее универсальным защитным механизмом растений. Полученные в работе экспериментальные данные по влиянию экзогенного пролина на биосинтез полиаминов и активности антиоксидантных ферментов у растений шалфея и теллунгиеллы солонцовой в нормальных условиях

и при действии стрессоров вносят значительный вклад в понимание механизмов регуляции компонентов антиоксидантной системы при адаптации растений к неблагоприятным условиям. Эти данные полезны в разработке технологии создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к UV -В облучению, засолению и другим стрессорам. Теоретические обобщения и совокупность экспериментальных данных работы используются при чтении курса лекций «Экологической биохимии» для студентов почвенного факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на конференциях и съездах: БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 11-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых, Пушкино, 2007, Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Сыктывкар, 2007, Леса Евразии - Русский север: VII Международная конференция молодых ученых. - МГУЛ, 2007, БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 12-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых, Пушкино, 2008; Международная конференция «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений», Екатеринбург, 2008; Межинститутский семинар ИФР РАН, Москва, 2008; Congress of the FESPB, Темпере, Финляндия, 2008; Международная научная конференция «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера», Апатиты, 2009; XVII International conference “Plant abiotic stress” Vienna, Austria, 2009; XVIII Congress of the FESPB, Валенсия, Испания, 2010; Съезд Общества физиологов растений России, Нижний Новгород, 2011.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 работ, из них 24 - в рецензируемых журналах или в журналах списка ВАК, 1 – глава в книге.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 206 страницах машинописного текста, включая 4 таблицы, 55 рисунков; библиография содержит 293 названия, из которых 258 на иностранном языке.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. Сформулированы основные представления об образовании и видах АФК в растении в нормальных и стрессовых условиях. Подробно рассмотрены вопросы функционирования низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов антиоксидантной

защитной системы растения.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. В качестве объектов исследований использовали дикорастущие растения трех групп, представляющих биомы двух климатических поясов, различающиеся по требованиям к влажности, освещенности, температурному режиму и составу почв (Жизнь растений, 1974).

1. Умеренный пояс (смешанный лес): Семейство розоцветных *Rosaceae*, **гравилат городской** *Geum urbanum* L. (далее - «гравилат»); Семейство сложноцветных *Asteraceae*; **мицелис стеной** *Micelis muralis* L. (далее - «мицелис»); Семейство лютиковых *Ranunculaceae*, **василистник водосборolistный** *Thalictrum aquilegifolium* L. (далее - «василистник»); Семейство подорожниковых *Plantaginaceae*, **подорожник большой** *Plantago major* L. Последнее растение характеризуется также как рудеральное (далее - «подорожник»);

2. Умеренный пояс (степь): Семейство крестоцветных *Brassicaceae*, **теллунгиелла солонцовая** *Thellungiella salsuginea* (Pallas) O.E.Schulz (экотип Shandong) (далее - «теллунгиелла»); Семейство сложноцветные *Asteraceae*, **полынь Лерха** *Artemisia lercheana* Web. (далее - «полынь»);

3. Субтропический пояс (вечнозеленые жестколистные леса и кустарники – маквес): Семейство яснотковых *Lamiaceae*, **базилик камфорный** *Ocimum basilicum* L. (далее – «базилик»); Семейство губоцветных *Lamiaceae* или *Labiatae*, **шалфей лекарственный** *Salvia officinalis* L. (далее – «шалфей»); Семейство лютиковых *Ranunculaceae*, **калинджи, или чернушка посевная** *Nigella sativa* L. (далее – «чернушка»).

Во всех экспериментах использовали 6-недельные растения, выращенные в водной культуре (Радюкина и др., 2007; Карташов и др., 2008).

Стрессорные факторы. Засоление и UV-B облучение являются классическими модельными стрессорами, позволяющими изучать механизмы защитного действия. Их интенсивность и продолжительность действия можно легко воспроизводить в условиях фитотрона. Оба стрессорных фактора, хлоридное засоление (100 мМ) и UV-B облучение (12,3 Кдж/м² в течение 10 мин), не характерны для представителей биоценозов южной тайги, но возникают в условиях лесостепей и солонцеватых степей. Интенсивность UV-B облучения в этих зонах, расположенных в широтах от 35 до 45°, составляет до 120 Мвт/м² в летние месяцы (Кондратьев и др., 2013). Используемая интенсивность UV-B

облучения и засоления вызывала у опытных растений изменения в исследуемых параметрах, но не приводила к серьезным внешним повреждениям.

Условия проведения опытов. Группы растений переносили на питательный раствор, содержащий 100 мМ NaCl, и выращивали в течение четырех суток (Радюкина и др., 2007 а). Группу растений, подвергавшихся обработке УФ-В, переносили в камеру с ультрафиолетовыми лампами и облучали в течение 10 мин, что соответствовало дозе облучения 12,3 кДж/м². После облучения растения перемещали в камеру фитотрона для фотореактивации и через 24 ч отбирали пробы листьев и корней интактных растений.

Взрослые растения теллунгиеллы и шалфея переносили на питательную среду с 2 мМ пролина, листья обрабатывали H₂O₂ (500 мкМ) и паракватом (PQ) (1мл раствора, содержащего 0,1 мМ параквата в 0,05% Твин-80) (Шашукова и др., 2010; Сошинкова и др., 2013).

Определение содержания свободного пролина в листьях и корнях растений проводили по методу Bates с соавт. (Bates et al., 1973).

Оценку содержания малонового диальдегида (МДА) в листьях и корнях растений проводили спектрофотометрическим методом (Heath, Packer, 1968).

Определение содержания свободного оксипролина проводили методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии на кафедре аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Определение общих растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина-Дениса (Загоскина, 2003). Содержание флавоноидов и антоцианов проводили по методу Mabry (Mabry et al., 1970).

Определение общей активности супероксиддисмутазы (СОД) проводили по методу Beauchamp, Fridovich, 1971.

Активность аскорбат пероксидазы (АП) и пролиндегидрогеназы (ПДГ) определяли спектрофотометрически (Nakano, Asada, 1981 и Mattioni et al., 1997).

Нативный гель-электрофорез СОД, АП проводили в полиакриламидном геле по стандартной методике Ornstein и Davis (Kliebenstein et al., 1998; Ornstein, 1964; Davis, 1964) на приборе «Mini protean 3», (Bio-Rad, США). В качестве стандарта использовали БСА. Визуализацию отдельных изоформ СОД проводили методом, предложенным Мизальским (Miszalski, 1998). Визуализацию изоформ АП проводили по методу, предложенному Миттлером и Зелинскас (Mittler, Zilinskas, 1993).

Определение активности свободной формы пероксидазы (ПО) проводили по методу, модифицированному Шевяковой с соавторами [Shevyakova et al., 2002].

Определение свободных полиаминов (ПА) проводили в виде дансильных производных с помощью ВЭЖХ по прописи (Marelli *et al.*, 2008).

Определение содержания белка в ферментных препаратах проводили спектрофотометрически с использованием красителя Кумасси R-250 по Эсену (Esen, 1978).

Уровень мРНК генов изоформ АП, СОД, а также генов метаболизма пролина, биосинтеза ПА исследовали методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров, сконструированных в программной среде Vector NTI и AliginX (Invitrogen, США), программы Vector NTI и базы данных www.ncbi.nlm.nih.gov. Тотальную РНК выделяли фенол-хлороформным (Krapp et al., 1993). Очистку от примесей ДНК, синтез кДНК осуществляли с использованием ферментов и реактивов фирмы «Fermentas» по протоколу производителя. Результаты ПЦР оценивали методом электрофореза нуклеиновых кислот в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Обработку полученных фореграмм проводили с помощью программы GelPro.

Представленные данные являются результатом трех независимых экспериментов и получены не менее чем в 3-кратной биологической и аналитической повторностях. Результаты, представляющие собою малые выборочные совокупности, обрабатывали статистически в среде Microsoft Excel 2007 и выражали как среднюю арифметическую величину \pm ошибка средней величины.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Сравнительный анализ функционирование антиоксидантной системы у растений, представляющих биомы двух климатических поясов, при засолении и UV-B облучении

Для ответа на вопрос, какие общие закономерности и какие отличия наблюдаются в функционировании антиоксидантной системы дикорастущих растений, мы использовали сравнительный анализ функционирования антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных метаболитов. Из множества антиоксидантных ферментов мы выбрали: уникальный и ключевой фермент - СОД, два разлагающих пероксид водорода фермента: ПО (свободной формы) и каталазу. Из низкомолекулярных метаболитов особое внимание было уделено пролину, ПА и веществам, обладающих фотозащитной функцией, антоцианам,

флавоноидам, каротиноидам, в листьях и корнях трех групп опытных растений, представляющих биомы двух климатических поясов, в контрольных и стрессорных условиях. Для доказательства развития ОС при действии выбранных стрессоров в листьях и корнях опытных растений был измерен уровень МДА – показателя перекисного окисления липидов. У всех растений через сутки и при действии засоления, и при действии UV-B облучения уровень МДА был повышен в среднем в 5-10 раз по сравнению с контролем. Это свидетельствовало о том, что для активации реакций образования АФК достаточно и кратковременного действия стрессоров.

3.1.1. Функционирование антиоксидантных ферментов у растений, представляющих биомы двух климатических поясов, в условиях засоления и облучения.

Участие СОД в защитном ответе растений на действие засоления и UV-B облучения. СОД является уникальным ключевым антиоксидантным ферментом. Именно в связи с этим мы начали свое исследование с изучения функционирования СОД у опытных растений при действии засоления и UV-B облучения, а также при моделировании ОС (PQ и H₂O₂). На рисунке 1а, б представлены данные по конститутивному и стресс-индуцированному уровню общей активности СОД. Уровень общей активности СОД у опытных растений различался как в контроле, так и при действии стрессоров (Карташов и др., 2007). Изменения в общей активности СОД, наряду с изменениями в уровне МДА, также являлись индикатором нарушения окислительно-восстановительного баланса растения. Самая высокая активность СОД в контроле и при засолении была обнаружена в корнях василистника и в листьях гравилата. Оба эти растения входят в одну группу и представляют биомы смешанных лесов умеренного пояса, в природе не испытывают дефицита влаги и не встречаются с засолением. Самой низкой активностью СОД была у теллунгиеллы и чернушки, представляющих биомы разных климатических поясов. У других исследованных растений активность СОД в корнях и листьях имела близкие значения.

Из данных видно, что при засолении у части растений ни в корнях, ни в листьях значимой активации СОД не происходило (рис. 1а, б). Однако в листьях гравилата, полыни и шалфея, корнях василистника и полыни отмечено стресс-индуцируемое повышение активности фермента. Возможно, при действии засоления инактивировались отдельные изоформы СОД, что могло приводить к снижению

общей активности. При действии UV-B облучения тенденция к активации СОД отмечалась в листьях и корнях у большего числа растений. Можно предположить, что при облучении происходило лишь незначительное ингибирование одних изоформ фермента и заметная активация других изоформ, что в результате могло приводить к повышению общей активности. Полученные данные показали, что только функционирование СОД не могло являться достаточным для защитного ответа на действие двух стрессоров. Кроме того, значимых различий у растений, принадлежащих к биомам двух климатических поясов, не отмечалось. Уровень активности фермента главным образом зависел от видовой принадлежности растения и природы действующего стрессора.

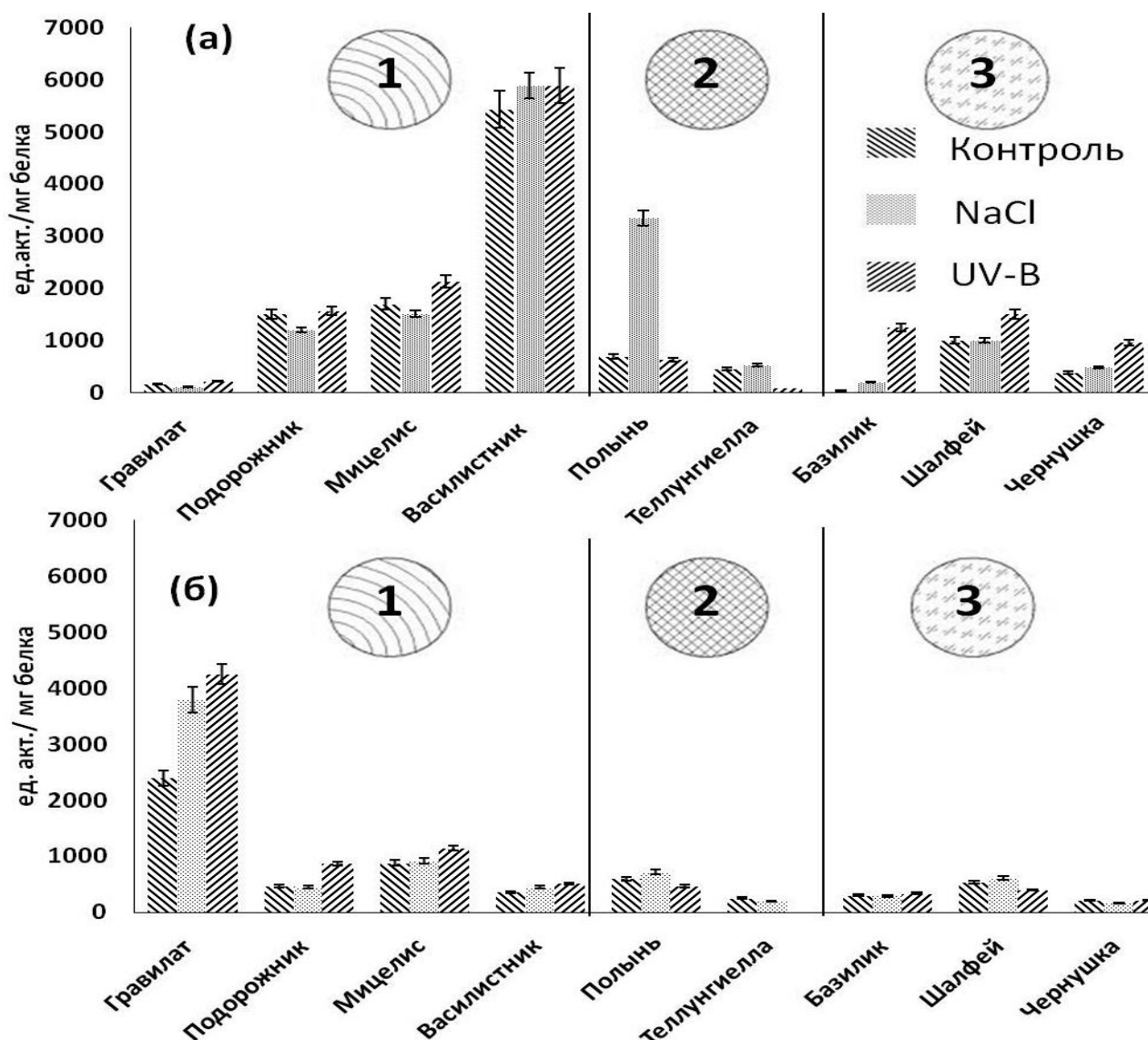


Рисунок 1. Сравнительный анализ общей активности СОД в корнях (а) и листьях (б) трех групп опытных растений при действии засоления и UV-B облучения. 1 – смешанный лес умеренного пояса, 2 – степи умеренного пояса, 3 – вечнозеленые жестколистые леса и кустарники субтропического пояса (Получено совместно с Ивановым Ю. В., Карташовым А.В., Шашуковой А.В.).

Анализ содержания мРНК генов, кодирующих изоформы СОД, на примере растений подорожника и теллунгиеллы. В литературе присутствуют данные о регуляции активности фермента на разных уровнях, в том числе, на уровне транскрипции (Gupta et al., 1993; Blokhina et al., 2003; Бараненко, 2006; Gill and Tuteja, 2010). При анализе уровня транскриптов мРНК генов изоформ СОД при засолении и облучении мы сфокусировались на двух растениях – подорожнике и теллунгиелле. Подорожник, согласно данным, представленным на рис. 1, продемонстрировал картину изменений активности СОД, сопоставимую с таковой для большей части исследованных растений, а теллунгиелла, как мы упоминали выше, является модельным растением. Мы преследовали две цели: с одной стороны, показать изменения в уровне транскриптов мРНК генов изоформ СОД при двух видах стрессоров, с другой стороны, увидеть различия между уровнем мРНК генов изоформ СОД в стрессорных условиях у модельного и дикорастущего растения. Методом гель-электрофореза в нативных условиях у теллунгиеллы и подорожника были обнаружены три главные изоформы СОД. При исследовании уровня мРНК генов, кодирующих изоформы СОД, показано, что у теллунгиеллы уровень мРНК гена *CSD1*, кодирующего Cu/Zn-изоформу, увеличивался через 24 ч и при засолении и при UV-B облучении. Уровень мРНК генов *MSD* (Mn-изоформа) и *FeSD1* (Fe-изоформа) у этого растения не изменялся ни при кратковременном засолении, ни при кратковременном облучении. Значительной активации СОД не наблюдалось (рис 1). Для подорожника стресс-индуцируемой экспрессии гена, кодирующего цитозольную изоформу СОД – Cu/Zn СОД, не обнаружено при кратковременном засолении, но отмечено при кратковременном действии UV-B облучения, на фоне повышения общей активности фермента.

3.1.2. Участие гваяколовых ПО и каталазы в защитном ответе растений на засоление и UV-B облучение

Очевидно, что рассмотрение антиоксидантной системы не возможно без хотя бы общего взгляда на функционирование ферментов детоксикации образовавшейся H_2O_2 : каталазы и гваяколовой ПО (свободной формы). Мы исследовали функционирование этих ферментов при засолении и действии UV-B облучения у тех же представителей биомов двух климатических поясов. Высокая конститутивная активность ПО в корнях отмечена у гравилата, теллунгиеллы, василистника (от 0,6 до 1,2 мкмоль гваякола), в листьях - у мицелиса,

теллунгиеллы (1,01 и 0,5 мкмоль). В корнях засоление активировало ПО только у теллунгиеллы – также на 50%. Листья большинства исследованных растений обладали активностью этой формы ПО в контроле от 0,3 до 1,0 ммоль гваякола/мг белка. При кратковременном действии засоления листья почти всех опытных растений отвечали повышением активности ПО примерно на 50%. При действии UV-B облучения в листьях опытных растений активность свободной формы ПО повышалась примерно на 30%. В корнях значимое повышение активности фермента отмечалось у теллунгиеллы и гравилата. Причем корреляции между изменением общей активности СОД и свободной формы ПО, как участников последовательных антиоксидантных реакций, ни при засолении, ни при облучении не наблюдалось. Этот факт можно объяснить многообразием путей утилизации образующейся H_2O_2 в растениях, а также множественностью изоформ семейства ПО (Herbette et al., 2003). Анализ изменений в активности каталазы при действии двух видов стрессоров было проведено лишь у гравилата, подорожника, теллунгиеллы и шалфея. Показано, что засоление снижало активность фермента у растений примерно на 10% и в корнях, и в листьях. Исключение составили растения гравилата, в листьях которых происходило увеличение активности фермента в два раза, что положительно коррелировало с высокой активностью СОД у этого растения. В листьях и корнях подорожника и гравилата UV-B облучение вызывало повышение активности каталазы на 10-15%. У теллунгиеллы при облучении наблюдалось ингибирование активности фермента и в корнях, и в листьях примерно на 20%. Для шалфея при действии стрессоров повышение активности фермента было незначительным и в корнях, и в листьях. Анализ активности ферментов детоксикации H_2O_2 продемонстрировал, что все исследованные растения обладали активной ПО (свободной формой). Очевидно, что функционирование ПО увеличивало эффективность защитного ответа при кратковременном действии стрессора на дикорастущие растения. Однако различий у растений разных групп, принадлежащих биомам двух климатических поясов, не наблюдалось. Также как и для СОД различия в функционировании ферментов детоксикации H_2O_2 в первую очередь зависели от видовой принадлежности растений. Отсутствие четких различий в активации ПО у опытных растений в стрессовых условиях связано с множественностью изоформ фермента, локализующихся в различных клеточных компартментах, кодируемых различными генами (Лебедева и др., 2003).

3.1.3. ПА и их роль в антиоксидантной защите у опытных растений при засолении и UV-B облучении

Кроме высокомолекулярных компонентов антиоксидантной системы необходимо было проанализировать вклад низкомолекулярных метаболитов в защитный ответ растений. Кроме того, важно было понять, может ли биосинтез низкомолекулярных метаболитов активироваться при кратковременном действии стрессоров. В последнее время накоплено большое количество данных о зависимости между изменениями во внутриклеточном содержании и спектре ПА и устойчивостью растений к действию стрессоров (Alcázar et al., 2010; Kuznetsov, Shevyakova, 2011). Но также как и для других низкомолекулярных метаболитов, данные, позволяющие сопоставить изменения в уровне ПА при кратковременном действии различных стрессоров, а также влияние увеличения эндогенного уровня свободных ПА на функционирование других компонентов антиоксидантной системы, очень малочисленны. Для выявления вклада ПА в функционирование антиоксидантной защиты было выбрано четыре растения, представляющих три группы растений.

Изменения в содержании свободных ПА у опытных растений в условиях засоления и UV-B. Выбранные растения мало различались по суммарному конститутивному содержанию свободных ПА как в корнях, так и в листьях (рис.2 а, б). В корнях растений наблюдалась следующая тенденция: незначительное увеличение содержания свободных ПА при засолении и некоторое снижение при облучении (рис. 2 а). В листьях растений засоление снижало суммарное содержание свободных ПА (рис. 2 б), а UV-B облучение, наоборот, увеличивало. Исключением были листья подорожника. Также как и в активации СОД и ПО, стресс-зависимые изменения в суммарном содержании свободных ПА и в корнях, и в листьях опытных растений определялись, прежде всего, видом растения и природой действующего стрессора. Разнонаправленность изменений в содержании и спектре ПА в корнях и листьях растений мы связываем с их транспортом по растению (Kuznetsov, Shevyakova, 2011). Влияние видоспецифичности и стресс-специфичности более заметно проявилось при анализе спектра индивидуальных ПА. В норме в корнях гравилата и шалфея обнаруживались сопоставимые количества свободного путресцина (Пут) и спермидина (Спд), у подорожника и теллунгиеллы преобладал свободный Спд. В листьях гравилата и шалфея основным ПА был Пут, у подорожника - Спд, у теллунгиеллы – Спд и Спм.

Вызванное засолением снижение суммы свободных ПА в листьях опытных растений определялось снижением содержания Пут и Спм (рис. 2 а, б). Увеличение количества свободного Спд при засолении было обнаружено только в листьях теллунгиеллы. В литературе указывается, что именно содержание свободного Спд может быть связано с устойчивостью растения к действию засоления (Kakkar, Sawney, 2003; Kuznetsov, Shevyakova, 2011; Minocha et al., 2014). В корнях опытных растений на фоне незначительных изменений суммы свободных ПА, их спектр изменялся: для гравилата изменения затрагивали все индивидуальные ПА, у подорожника – Спд и Спм, у теллунгиеллы – Спд, у шалфея – Пут (рис. 2 а). При анализе изменений в содержании и спектре свободных ПА в листьях шалфея, теллунгиеллы и подорожника при действии UV-B облучения привлекает внимание увеличение содержания свободного Пут (рис. 2 б). У гравилата Пут накапливается при засолении. Это свидетельствует о неравнозначном вкладе индивидуальных ПА в антиоксидантную защиту и о различиях в регуляции скорости биосинтеза индивидуальных ПА.

Таким образом, проведенные исследования показали, что биосинтез низкомолекулярных метаболитов может активироваться даже при кратковременном действии стрессоров. В листьях растений стресс-индуцируемое повышение содержания свободных ПА, особенно Пут, наблюдалось при кратковременном действии UV-B облучения, но не изменялось при засолении. В корнях имела место обратная тенденция: увеличение при засолении и снижение при UV-B облучении. Этот факт может служить дополнительным доказательством связи свободных ПА с повышением уровня АФК. Это также подтверждается отсутствием существенных различий в изменении общего содержания свободных ПА у растений, принадлежащих к разным группам, т.е. все растения испытывали негативное действие стрессора и активация биосинтеза ПА была вкладом в защитный ответ. Важно заметить, что различия в спектре ПА зависели от вида растений и природы действующего стрессора. Кроме того, наблюдалась и органоспецифичность в содержании и спектре ПА. Наиболее ярко органоспецифичность проявилась в повышении содержания кадаверина в растениях теллунгиеллы и подорожника при действии UV-B облучения: у подорожника его содержание повышалось в корнях, у теллунгиеллы в листьях (Иванов, 2008). Эта органоспецифичность также определялась природой

действующего стрессора, а именно: засоление вызывало повышение уровня ПА прежде всего в корнях, облучение - в листьях

Анализ уровня мРНК генов биосинтеза ПА на примере растений теллунгиеллы и подорожника при действии засоления и UV-B облучения. Анализируя различия в действии засоления и UV-B облучения на содержание и спектр свободных ПА у опытных растений, можно было предположить, что причиной этого явления служат серьезные различия в интенсивности экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза ПА. Среди генов, кодирующих ферменты биосинтеза ПА, выделяется ряд ключевых: *SAMS* - ген S-аденозилметионинсинтазы, осуществляющей синтез S-аденозилметионина из метионина, *SAMDC* – ген S-аденозилметиониндекарбоксилазы, являющейся скоростью-лимитирующим фактором в синтезе ПА, *SPDS* - ген спермидинсинтазы, *SPMS* – ген сперминсинтазы. Анализ уровня мРНК указанных генов у двух растений подорожника и теллунгиеллы показал, что действие засоления повышало уровень мРНК генов *SAMC*, *SPDS1*, *SPMS1* в листьях теллунгиеллы, что согласовалось с изменением содержания свободных Спд и Спм (рис. 2 а, б). UV-B облучение вызывало, кроме изменений в уровне мРНК генов *SAMC*, *SPDS1*, *SPMS1*, еще и повышение уровня мРНК *SPMS2* у теллунгиеллы, что сопровождалось снижением содержания свободных Спм и Спд. Следует отметить, что при облучении повышение уровня мРНК генов коррелировало с увеличением дозы облучения. Аналогичная дифференциация в экспрессии генов биосинтеза ПА отмечалась и для подорожника при действии засоления и облучения.

Таким образом, полученные данные о стресс-зависимых изменениях в содержании свободных ПА и уровне экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты их биосинтеза позволяют сделать вывод, что хотя только UV-B облучение вызывало повышение содержания свободного Пут, усиление экспрессии ключевых генов наблюдалось и при засолении, и при UV-B облучении. Повышение уровня мРНК ключевых генов у теллунгиеллы, хотя и связано с изменениями в спектре свободных ПА, но не является достаточным для регуляции их эндогенного содержания (Copa et al. 2006; Alcázar et al., 2010). Возможно, основную роль в регуляции спектра индивидуальных эндогенных ПА у теллунгиеллы играет полиаминоксидаза, которая может осуществлять обратное превращение одних ПА в другие (Королькова и др., 2014). Кроме того, данные, полученные для теллунгиеллы, аналогичны таковым, полученным для

подорожника. Это позволяет предположить, что при действии засоления или UV-B облучения такие изменения в содержании и спектре свободных ПА и в уровне мРНК ключевых генов биосинтеза ПА являются сходными для двух растений.

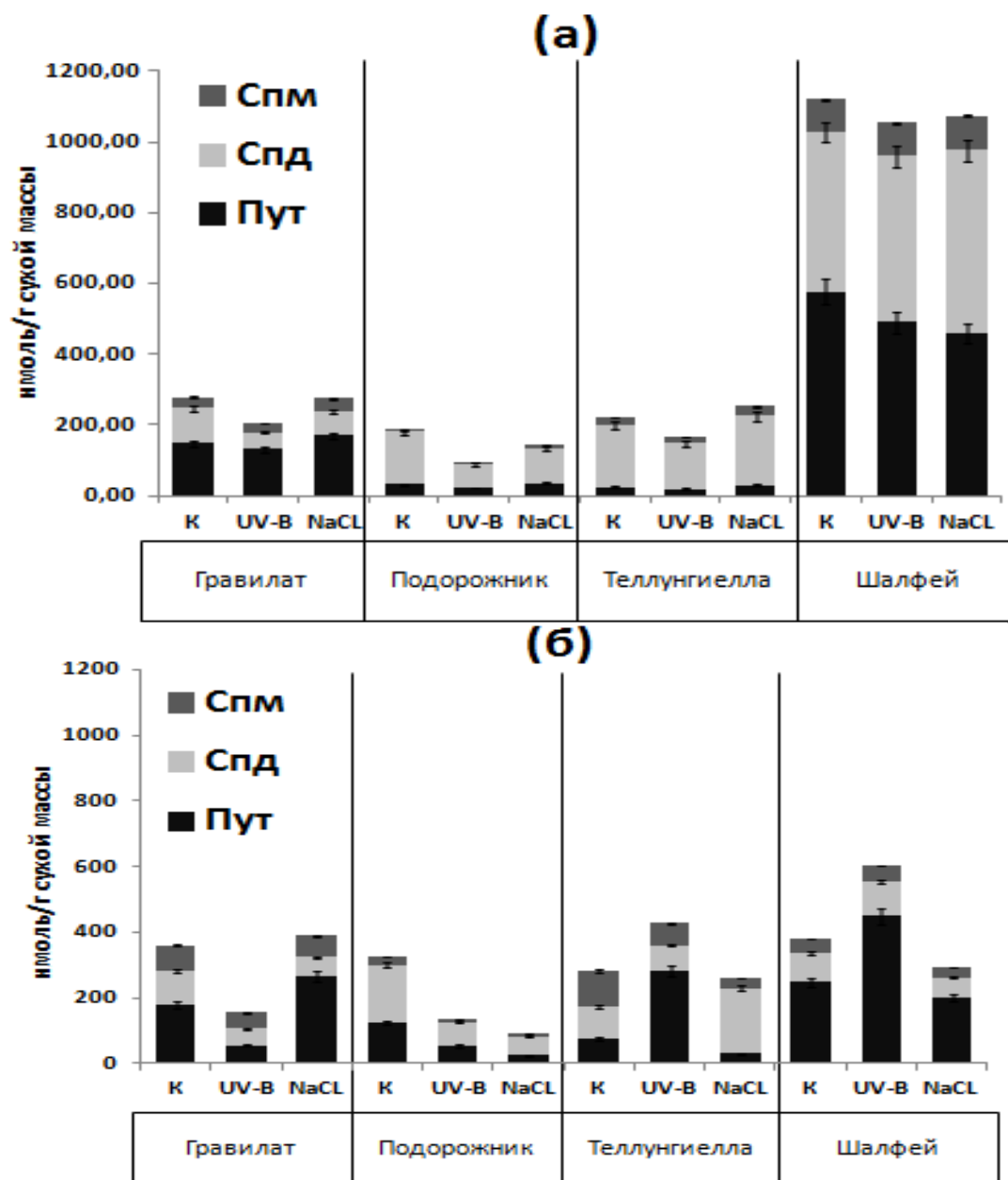


Рисунок 2. Сравнительный анализ содержания индивидуальных ПА у некоторых опытных растений при засолении и UV-B облучении: а – корни; б - листья. (Получено совместно с Ивановым Ю. В., Шашуковой А.В., Мапелли С.).

Изменения в содержании конъюгатов ПА у подорожника, гравилата, шалфея и теллунгиеллы при действии UV-B облучения. Наряду со свободными ПА в растениях присутствуют растворимые и нерастворимые конъюгаты ПА (Lutz et al., 2005; Шевякова и др., 2009). Однако при действии стрессоров редко проводят анализ пула всех форм ПА, хотя это представляется чрезвычайно важным.

Определение содержания конъюгатов было проведено в листьях и корнях подорожника, шалфея и теллунгиеллы при действии UV-B облучения. Анализ данных позволил сделать вывод, что при действии UV-B облучения предпочтительной формой индивидуальных ПА у исследованных растений и в листьях, и в корнях является свободная. Однако в корнях наблюдалось некоторое увеличение доли конъюгатов у всех исследованных растений. Наиболее наглядная разница у опытных растений наблюдалась в содержании свободной и конъюгированной форм кадаверина. В листьях свободный и связанный кадаверин обнаружен у подорожника, причем облучение уменьшало содержание обеих форм. У гравилата в листьях облучение вызывало образование его конъюгатов, а у теллунгиеллы - увеличение свободного кадаверина. В корнях у гравилата наблюдалось увеличение свободной формы, у теллунгиеллы в контроле обнаруживалась только конъюгированная форма, которая практически исчезала при облучении. У шалфея кадаверин не обнаруживался.

Полученные данные подтверждают таковые, полученные Прудниковой (Прудникова, 2006), которая выявила схожие закономерности при облучении растений *Arabidopsis thaliana*. Можно только предполагать, что переход одной формы в другую зависит от многих причин, в том числе, от уровня кофейной и феруловой кислот, которые участвуют в образовании конъюгатов (Son and Lewis, 2002). Однако, следует отметить, что общим выводом из проведенных исследований может служить отмеченный факт, что при UV-B облучении имела место тенденция к снижению образования конъюгированных форм в листьях исследованных растений и увеличению количества свободных ПА (Шашукова и др., 2011). Из приведенных выше данных следует вывод, что эффективность конкретных форм ПА опытных растений в защитном ответе определяется как видовой специфичностью, так и видом действующего стрессора. Кроме того, полученные данные по содержанию свободных ПА у гравилата, подорожника, теллунгиеллы и шалфея показали, что аккумуляция свободных ПА у исследованных растений являлась органоспецифичной.

3.1.4. Изменения в содержании внутриклеточного пролина у растений при действии засоления и UV-B облучения

Наиболее дискуссионной в физиологии растений остается роль универсального метаболита и протогенной аминокислоты – пролина. Факты, доказывающие участие этого соединения в защитном ответе растений и животных на действие

стрессоров представлены в многочисленных публикациях (Шевякова, Кузнецов, 1999; Kavi Kishor et al., 2005; Krishnan et al., 2008). Однако и в настоящее время изучение его роли в защитном ответе организмов остается актуальным.

Конститутивный уровень пролина. Проведенное нами сравнительное изучение содержания пролина (Радюкина и др., 2007 а, б; Карташов и др., 2008) показало, что среди растений, принадлежащих к биома двух климатических поясов присутствовали виды с его высоким конститутивным содержанием в корнях и листьях (рис. 3 а, б). Таким образом, конститутивный уровень этого метаболита оказался также видоспецифичным, как и все обсуждаемые выше компоненты антиоксидантной системы. И также как исследованные выше параметры (СОД, ПО и ПА) не зависели от принадлежности к климатическому поясу. Следует также отметить, что конститутивное содержание пролина у исследованных растений не было однопорядковым в листьях и корнях, что свидетельствует об органоспецифичности аккумуляции метаболита (рис. 3а, б). Такая органоспецифичность также определялась видовой принадлежностью. Так у теллунгиеллы и чернушки в листьях содержание пролина в контрольных условиях было выше, чем в корнях практически на порядок. У остальных исследованных видов растений конститутивное содержание пролина было сопоставимо в листьях и корнях (рис. 3а, б).

Действие засоления. В условиях засоления, как следует из рисунка 3, стресс-индуцированное повышение уровня пролина в корнях (а) и листьях (б) наблюдалось у всех растений, представляющих биомы двух климатических поясов за исключением чернушки, имевшей самый высокий конститутивный уровень пролина. В условиях засоления его содержание в листьях незначительно снижалось, а в корнях оставалось таким же низким как в контроле (рис. 3а, б). Растения шалфея, хотя и отличались низким конститутивным уровнем пролина в листьях и корнях (0,2 мкмоль/сырой массы), но в условиях засоления его содержание возрастало в 3-4 раза. То же самое можно сказать и о повышении содержания пролина при засолении у гравилата – с 0,04 мкмоль/г сырой массы до 2 мкмоль, что больше в 500 раз. Из этого можно сделать вывод, что степень активации конкретной биохимической реакции, приводящей к синтезу необходимого защитного метаболита, зависит от вида растения и не всегда означает более высокую степень устойчивости. Кроме того, можно утверждать, что повышение содержания пролина при кратковременном действии засоления не

создает концентрацию этого метаболита достаточную для осмопротекции, поэтому мы считаем, что в этих условиях пролин может выполнять только антиоксидантную функцию.

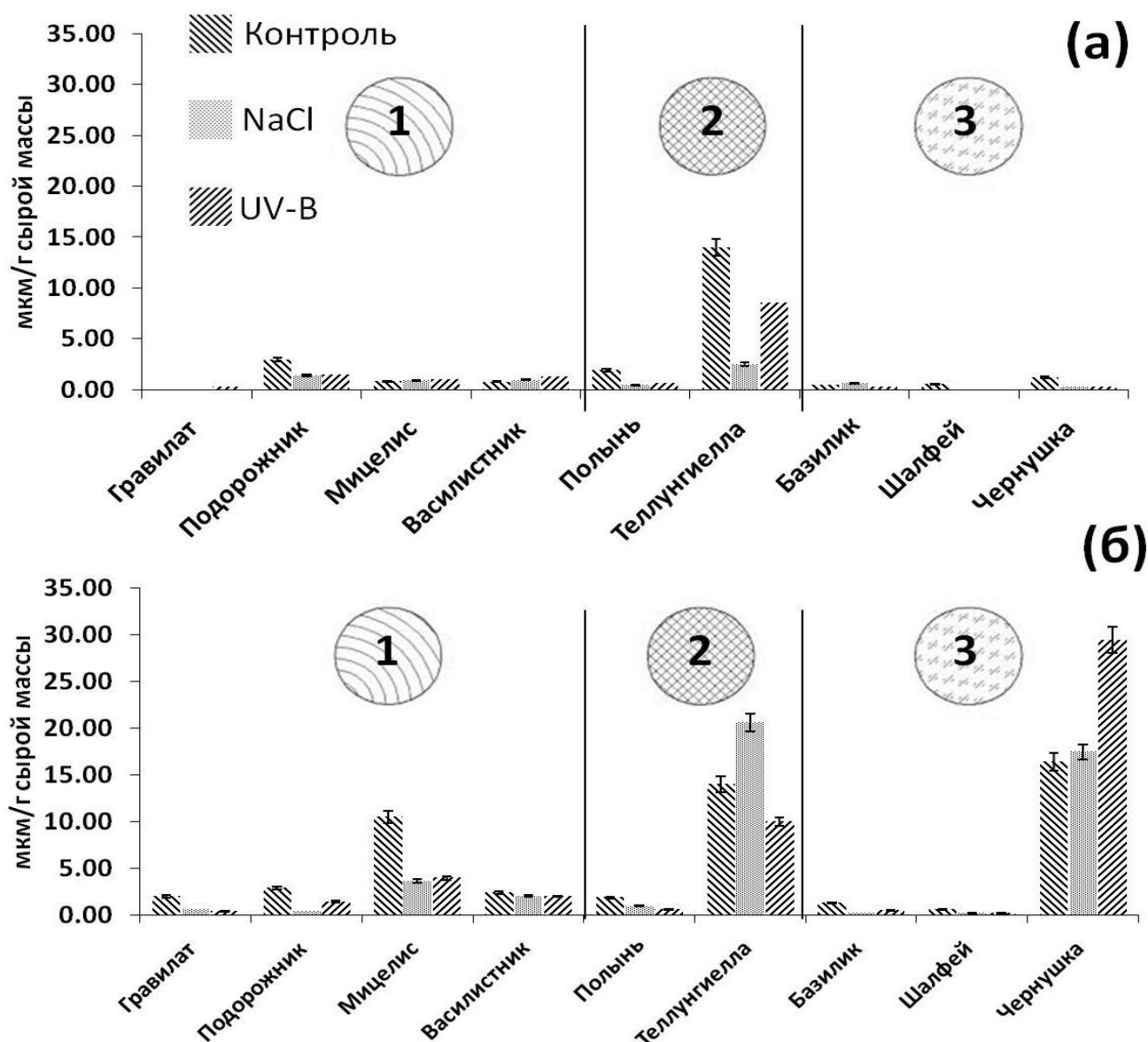


Рисунок 3. Сравнительный анализ содержания пролина в корнях (а) и листьях (б) трех групп опытных растений через сутки после действия засоления и UV-B облучения 1 – смешанный лес умеренного пояса, 2 – степи умеренного пояса, 3 – вечнозеленые жестколистые леса и кустарники субтропического пояса (Получено совместно с Ивановым Ю.В., Карташовым А.В., Шашуковой А.В., Тоайма В.).

Действие UV-B облучения. Участие пролина в защитном ответе на повышенное образование АФК при кратковременном действии UV-B облучения иллюстрируется изменениями в его содержании у опытных растений. Данные, полученные для двух видов, лидеров по конститутивному уровню пролина, теллунгиеллы и чернушки, показали (рис.3а, б), что оба эти вида сохраняли такую же тенденцию в изменении содержания пролина в листьях в ответ на действие как

засоления, так и UV-B облучения. Так у теллунгиеллы при кратковременном действии этого фактора содержание пролина возрастало в листьях в обоих случаях, а у чернушки содержание пролина незначительно снижалось и в условиях засоления и при облучении (рис. 3б). Корни теллунгиеллы реагировали прямо противоположным образом на действие засоления и UV-B облучения, увеличивая содержание пролина при засолении, но достоверно снижали его уровень при действии облучения. Такая же картина наблюдалась и в корнях полыни. В корнях чернушки облучение вызывало достоверное повышение содержания этой аминокислоты (рис. 3а). В листьях остальных изучаемых растений, за исключением обсуждаемых выше, содержание пролина снижалось или имело тенденцию к снижению при облучении (рис. 3б). Поскольку изменения содержания пролина при засолении и UV-B облучении наблюдались у представителей биомов двух климатических поясов, то его можно рассматривать как обязательного участника защитного ответа. Такая картина иллюстрирует функционирование пролина не только как в осмопротектора, но и антиоксиданта.

3.1.5. Изменения в содержании пролина у растений в условиях ОС, вызванного H₂O₂ и PQ

Для подтверждения антиоксидантных свойств пролина, проявляющихся при действии облучения, мы провели серию экспериментов по действию параквата и H₂O₂ на шалфей и теллунгиеллу, контрастных по конститутивному уровню пролина. При действии PQ, индуктора супероксидного анион-радикала, в пластидах и митохондриях, на теллунгиеллу и шалфей содержание пролина увеличивалось в темновой период до 20 и до 0,8 мкмоль/г св. массы соответственно, но снижалось при перенесении исследуемых растений на свет до 10 и до 0,6 мкмоль / г св. массы соответственно. При действии H₂O₂ содержание пролина у теллунгиеллы и шалфея повышалось до 23 мкмоль и 0,9 мкмоль через 24 ч (Шашукова и др. 2009; Сошинкова и др., 2013). Кроме этого, при действии H₂O₂ на теллунгиеллу было обнаружено повышение содержания свободного оксипролина, которой является продуктом окисления пролина. Полученные данные указывают на то, что изменения в содержании пролина у обоих исследованных видов, действительно, вызываются повышенным образованием АФК в клетке.

Уровень мРНК генов метаболизма пролина при действии различных абиотических стрессоров на примере теллунгиеллы. Участие пролина в защитном ответе на

действие засоления, облучения и модуляторов окислительного стресса поставило вопрос об изменениях в уровнях транскриптов генов его метаболизма. Влияние абиотических факторов на транскрипционном уровне мы изучали на примере теллунгиеллы. Изменения в уровне экспрессии генов метаболизма пролина в условиях действия стрессоров, проведенное на примере теллунгиеллы, показало, что повышение уровня мРНК генов биосинтеза пролина согласуется с повышением его внутриклеточного содержания. Повышение интенсивности экспрессии генов биосинтеза пролина наблюдалось также при действии модуляторов ОС (Radukina et al., 2011; Сошинкова и др., 2013). Это согласуется с показанной нами, наряду с другими авторами, способностью пролина участвовать в нейтрализации АФК, замещая СОД или действуя наряду с ней. С другой стороны, усиление экспрессии генов катаболизма пролина при действии исследованных стрессоров, возможно, связано с необходимостью функционирования «пролинового цикла». Этот цикл важен для поддержания *de novo* образования глутамата в митохондриях, для повторного его использования в биосинтезе других важных для жизнедеятельности растений метаболитов (ПА, аминокислоты и др.) и в качестве энергетического ресурса, как это показано для животных организмов (Szabados and Savoure, 2008; Miller et al., 2009).

3.1.6. Влияние UV-B облучения и засоления на содержание низкомолекулярных метаболитов, выполняющих фотозащитную и антиоксидантную функции

В отличие от пролина, который является одним из основных метаболитов при засолении, защитную роль антоцианов, каротиноидов, флавоноидов связывают в большей степени с действием на растения UV-B облучения (Costa et al., 2002). В связи с этим было важно ответить на вопрос, какие различия могут наблюдаться во влиянии двух различных стрессоров на внутриклеточный уровень таких антиоксидантов. С этой целью были выбраны три растения, являющиеся представителями одной средиземноморской климатической зоны, но разных биомов: лесостепи (чернушка и базилик) и солонцевой степи (полынь) (Радюкина и др., 2012). Представленные на рисунке 4 данные показали, что у трех растений конститутивный уровень антоцианов, каротиноидов, флавоноидов различался, так же, как и уровень пролина. При UV-B облучении у всех растений увеличивалось содержание антоцианов и флавоноидов. При засолении содержание антоцианов

изменялось в меньшей степени или оставалось на уровне контроля, но возрастало содержание каротиноидов. Следует отметить, что вклад каждого индивидуального метаболита в сумму низкомолекулярных антиоксидантов как в контроле, так и при стрессе существенно отличался и определялся видовой принадлежностью опытных растений. Полученные результаты являются дополнительным доказательством существования избирательности при активации той или иной реакции антиоксидантной системы, определяемой видом растения и природой стрессорного фактора. Известно, что биосинтез ПА сопряжен с биосинтезом вторичных метаболитов фенольной природы. Усиление биосинтеза ПА также как и биосинтеза низкомолекулярных веществ фенольной природы характерно для действия UV-B облучения на растения [Frohnmeyer, Staiger, 2003; Kuznetsov, Shevyakova, 2011; Кондратьев и др., 2013]. Возможно, увеличение суммы свободных ПА и антоцианов и флавоноидов при действии UV-B облучения является комплексным защитным ответом.

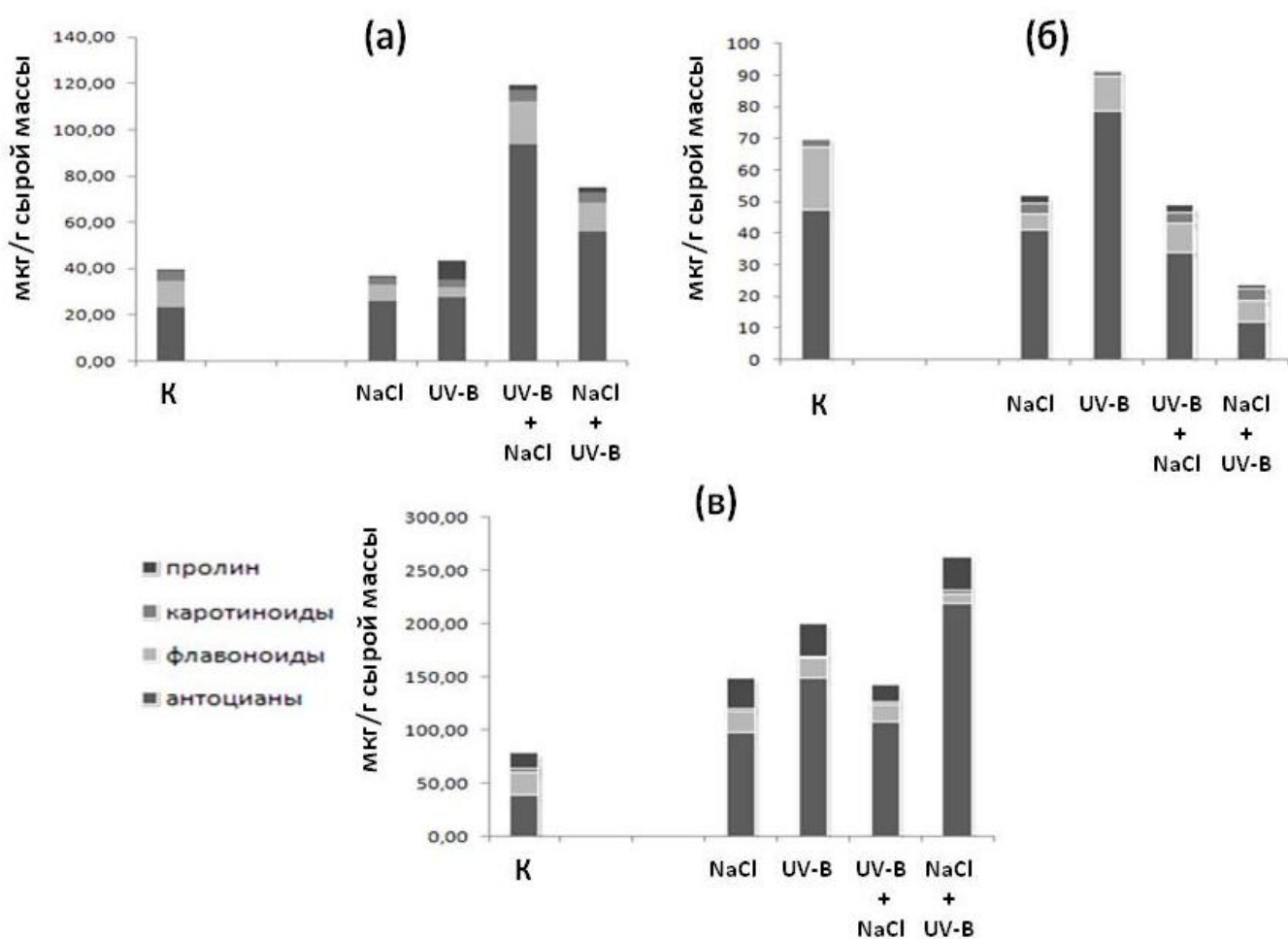


Рисунок 4. Сравнительный анализ содержания низкомолекулярных метаболитов пролина, каротиноидов, флаваноидов и антоцианов в листьях базилика (а), полыни (б), чернушки (в) при засолении, UV-B облучении и их последовательном действии. (Получено совместно с Тоайма В.).

3.1.7. Избирательность в активации антиоксидантных реакций у растений, представителей биомов двух климатических поясов, при действии UV-B облучения и засоления

При сравнении изменений в общей активности СОД с содержанием пролина в растениях в контроле, при засолении и UV-B облучении (рис. 1 и 3) можно было наблюдать обратную зависимость между этими величинами. Другими словами, в контроле у растений с высокой общей активностью СОД эндогенное содержание пролина было низким, и наоборот. При действии засоления этот характер взаимоотношений между двумя величинами сохранялся, что иллюстрируется схемой, представленной на рисунке 5 а. Самыми контрастными видами в этом отношении были гравилат и теллунгиелла. При сравнении общей активности СОД и содержания пролина при действии UV-B облучения также отмечен такой характер взаимоотношений (рис. 5 б).

Таким образом, при сравнении общей активности СОД и содержания пролина у исследованных растений в контроле, при действии засоления и UV –В облучения был выявлен реципрокный характер взаимоотношений этих двух факторов.

Влияние последовательного действия UV-B облучения и засоления на содержание пролина и общую активность СОД у трех опытных растений. Для подтверждения избирательности в активации СОД или биосинтеза пролина была проведена серия экспериментов с последовательным действием облучения и засоления на растениях двух биомов: базилика, чернушки и полыни. При последовательном действии двух факторов в любом порядке на базилик, чернушку и полынь облучение оказывало ингибирующее действие на содержание пролина в листьях, но стимулировало активность СОД. Засоление тормозило активность СОД в листьях, но повышало содержание пролина. В корнях обе тенденции сохранялись. Кроме того полученные данные продемонстрировали, что растения, у которых конститутивно заложена способность интенсивного биосинтеза пролина, используют это защитное соединение при кратковременном действии обоих стрессоров и их последовательном применении. Однако при последовательном действии двух факторов не наблюдалось синергизма в активации антиоксидантных реакций, а сохранялась зависящая от вида стрессора дифференциация. При рассмотрении изменений в содержании других низкомолекулярных антиоксидантов при последовательном действии двух стрессоров также подтвердилась избирательность в накоплении антоцианов и

флавоноидов при UV-B облучении и каротиноидов и пролина при засолении. Но общей тенденции, отражающей синергизм или антогонизм при действии двух факторов, у трех растений не наблюдалось.

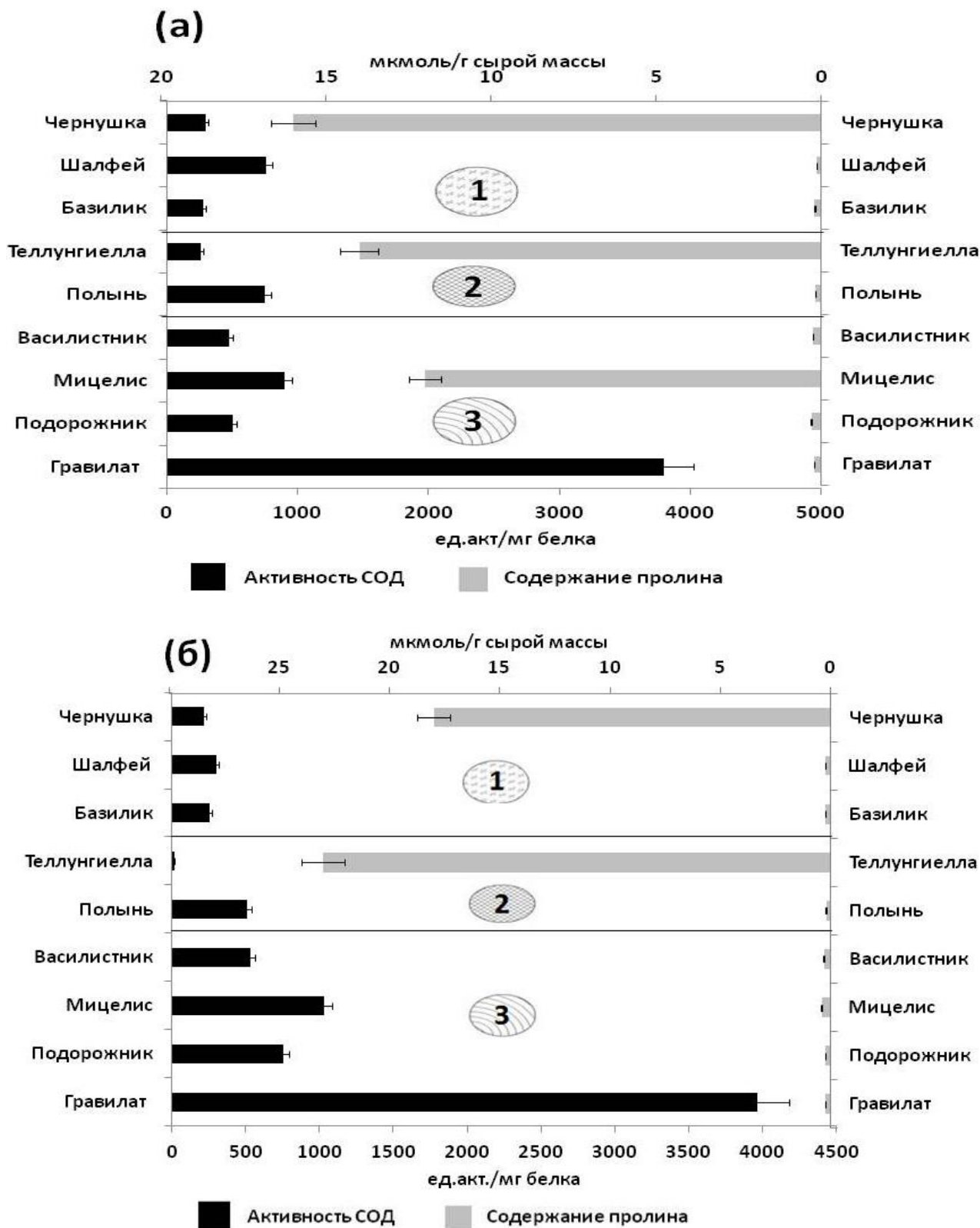


Рисунок 5. Схема соотношений между уровнем пролина (левая шкала) и активностью СОД (правая шкала) у растений трех групп при действии засоления (а) и UV-B облучения (б).

3.2. Особенности функционирования антиоксидантной защитной системы при искусственном повышении внутриклеточного содержания низкомолекулярных метаболитов в нормальных условиях и при действии стрессоров на примере шалфея и теллунгиеллы

Представленные выше данные о функционировании антиоксидантных реакций показали, что в растительной клетке существует избирательность в активации тех или иных метаболических путей при кратковременном действии стрессоров. Аккумуляция пролина и активация ключевого фермента антиоксидантной защиты СОД у растений находились в реципрокных отношениях (рис. 5), увеличение содержания ПА, антоцианов характерно для облучения. Такая избирательность ранее была показана только для антиоксидантных ферментов (Kang et al., 1999; Rizhsky et al., 2002; Nounjan et al., 2012). Для ответа на вопрос о возможных причинах реципрокности накопления пролина и активности СОД а также на вопрос об уникальности такого влияния для пролина, мы использовали метод создания искусственного избытка двух метаболитов – пролина и Спм, добавлением их в питательную среду растений. В качестве модельных растений были использованы шалфей и теллунгиелла, контрастные по конститутивному уровню пролина.

Действие экзогенного пролина и спермина на контрольные растения. Добавление экзогенного пролина в питательную среду контрольных растений шалфея приводило к изменению его эндогенного уровня в листьях и корнях в 30 раз (с 0.2-0.3 до 9 мкмоль/г св. массы). Кроме того, наблюдалось повышение уровня МДА, снижение активности СОД и ПО, при этом активировались ПДГ и каталаза. Экзогенный пролин не вызывал изменений в содержании ПА в листьях, но повышал содержание Пут в корнях. Изоферментный состав СОД в листьях шалфея при действии экзогенного пролина не изменялся. Увеличение содержания МДА (в два раза), активация ПДГ, СОД и АП (примерно на 10-20%) наблюдались также при добавлении пролина в питательный раствор контрольных растений теллунгиеллы. При этом содержания внутриклеточного пролина в листьях вырастало в 2-5 раз (с 8,21 до 19,28 мкмоль/ г св. массы). Однако повышения содержания свободных ПА в листьях этого растения не происходило, отмечалось повышение содержания свободного оксипролина (с 1500 до 2700 нг/г сыр. массы), что указывало на окисление пролина. Анализ изоферментного состава СОД у данного растения показал, что экзогенный пролин активировал Cu/Zn- и Fe-СОД

изоформы (рис. 6), а также вызывал появление новых низкомолекулярных изоформ АП (с молекулярной массой около 67 кДа и ниже) (рис. 7).

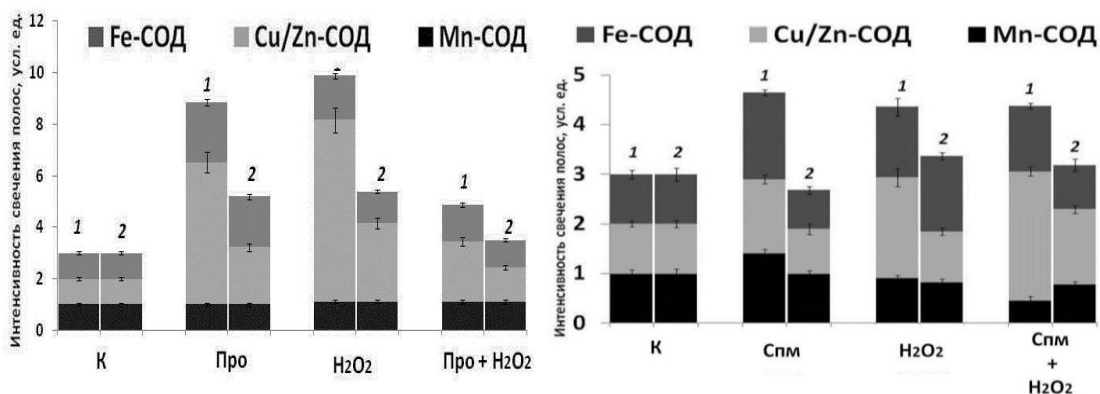


Рисунок 6. Спектр изоформ СОД в контроле и при действии экзогенного пролина или Спм, H_2O_2 и совместном действии H_2O_2 и/или Спм и пролина в корнях (1) и листьях (2) теллунгиеллы.

Добавление в питательную среду растений шалфея и теллунгиеллы 1 мМ Спм не приводило к изменениям уровня МДА, активности каталазы, но вызывало незначительное повышение содержания пролина в корнях и листьях. В корнях и листьях теллунгиеллы при обработке Спм отмечено некоторое повышение активностей СОД и АП (примерно на 10-15%). Следует отметить, что при обработке Спм растений шалфея наблюдалась та же тенденция. В растениях теллунгиеллы Спм в контрольных условиях повышал активность всех трех изоформ СОД в корнях и снижал активность Fe-СОД в листьях, не затрагивая другие изоформы (рис. 6). Спм в контрольных условиях изменял также и изоферментный спектр АП в корнях и листьях теллунгиеллы: появлялись новые изоформы фермента, в листьях – низкомолекулярная в корнях и высокомолекулярная (рис. 8).

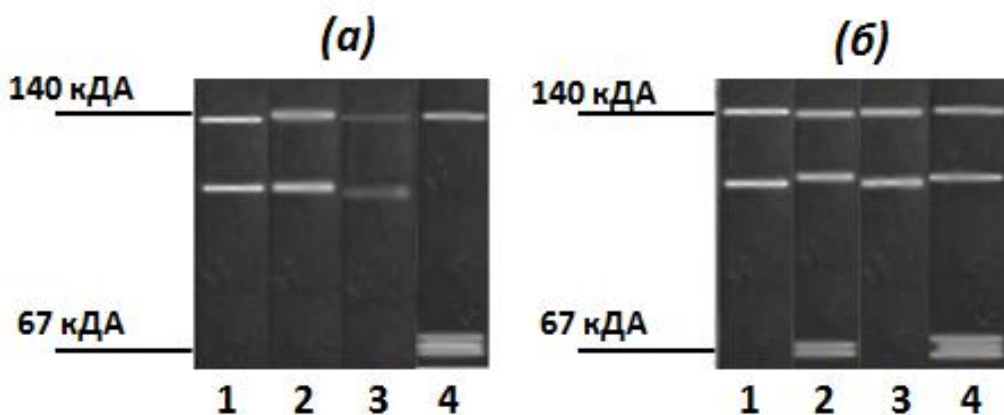


Рисунок 7. Спектр изоформ АП в корнях (а) и листьях (б) теллунгиеллы: 1 – контроль, 2 - действие экзогенного пролина, 3 – действие H_2O_2 , 4 - совместное действие пролина и H_2O_2 .

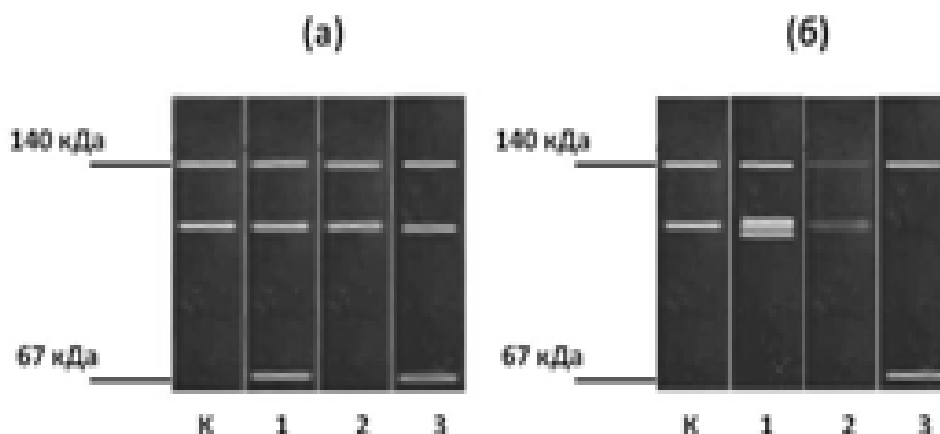


Рисунок 8. Изоформы АП в корнях (а) и листьях (б) теллунгиеллы в контроле (К), а также при действии экзогенного Спм (1), H_2O_2 (2) и их совместном действии (3).

Таким образом, искусственное изменение содержания низкомолекулярных метаболитов пролина и Спм в растениях теллунгиеллы и шалфея в контрольных условиях приводило к изменениям в функционировании антиоксидантной системы. При этом прооксидантные свойства пролина были выражены более сильно.

Действие экзогенного пролина и Спм совместно со стрессорами. Исследование действия пролина и Спм на растения теллунгиеллы и шалфея в контрольных условиях показало, что пролин и Спм оказывали прооксидантный эффект на растения. Совсем другая картина наблюдалась нами при действии этих метаболитов на растения шалфея и теллунгиеллы совместно со стрессорами.

Использование совместной обработки растений теллунгиеллы пролином или Спм и H_2O_2 , а также растений шалфея UV-B совместно с пролином показало, что в обоих случаях пролин снижал повреждающее действие указанных стрессоров (снижение уровня МДА). В растениях шалфея экзогенный пролин на фоне UV-B облучения стабилизировал активность СОД на более высоком уровне по сравнению с действием только облучения. Экзогенный пролин снимал ингибирующее действие облучения на каталазу, ингибировал активность свободной формы ПО, а также повышал аккумуляцию свободных ПА и их растворимых конъюгатов в корнях и листьях по сравнению с действием только облучения. Следует отметить, что при обработке Спм совместно с H_2O_2 или PQ растений шалфея наблюдалось небольшое повышение активности СОД в листьях и корнях, незначительное увеличение содержания пролина, но уровень МДА не изменялся. Присутствие экзогенного пролина в питательной среде теллунгиеллы

снижало ингибирующий эффект H_2O_2 на общую активность СОД и АП. Использование обработки Спм и H_2O_2 растений теллунгиеллы приводило к повышению активности СОД (примерно в два раза), незначительному увеличению активности АП в корнях и листьях. Ни в листьях, ни в корнях не наблюдалось достоверных изменений содержания МДА и активности каталазы.

Обобщая полученные данные можно заключить, что пролин и Спм проявляли антиоксидантные свойства при добавлении в питательную среду растений теллунгиеллы и шалфея, находящихся в стрессорных условиях. Хотя в контрольных условиях обработка Спм растений теллунгиеллы не приводила к повышению уровня МДА, он оказывал влияние на активность изоформ СОД и в корнях и в листьях. Это также подтверждало предположение, что при кратковременном действии стрессоров существует дифференциация в активации антиоксидантных реакций.

3.3. Влияние экзогенного пролина и Спм на спектр изоформ СОД и АП, а также уровень мРНК генов изоформ у растений шалфея и теллунгиеллы в условиях действия стрессора

Представленные выше данные свидетельствуют о том, что пролин и Спм при стрессе вовлекаются в регуляцию функционирования СОД и АП. Однако в настоящее время остается неизвестным, влияют ли низкомолекулярные метаболиты только на функционирование белков, или опосредовано изменяют уровень мРНК генов, кодирующих изоформы СОД и АП. Для ответа на этот вопрос мы также использовали растения шалфея и теллунгиеллы.

Изоферментный спектр СОД в листьях растений шалфея при совместном действии UV-B облучения и пролина. Изучение активностей идентифицированных нами изоформ показало, что в листьях шалфея, облученных UV-B, наибольший вклад в повышение общей активности СОД вносили Fe- и Cu/Zn-СОД, тогда как вклад Mn-СОД был незначительным. Внесение экзогенного пролина в питательную среду растений шалфея, подвергнутых кратковременному облучению UV-B, не повлияло на активности Mn-СОД и Cu/Zn-СОД. В то же время в присутствии пролина через 24 ч увеличивалась активность Fe-СОД изоформы, а через 36 ч появлялись две новые, отсутствовавшие ранее формы изозима (рис.9).

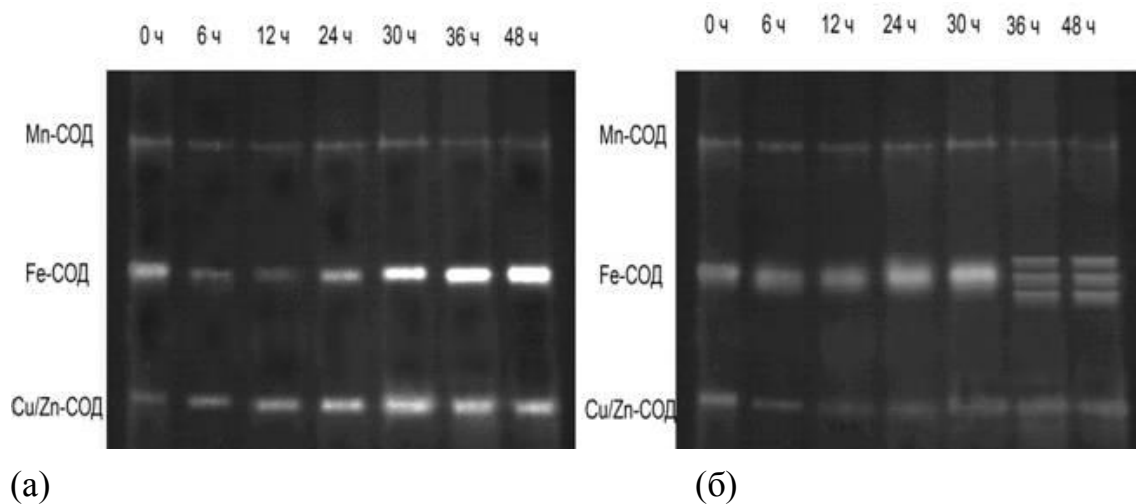


Рисунок 9. Изоферментный спектр СОД в листьях шалфея: а – при UV-B облучении, б – при совместном действии UV-B облучения и пролина (Получено совместно с Шашуковой А.В., Макаровой С.Н.).

Сравнительное исследование совместного действия экзогенного пролина или Спм и H_2O_2 на изоферментный спектр СОД и АП в растениях теллунгиеллы. Исследование совместного действия пролина и H_2O_2 на растения теллунгиеллы показало, в корнях пролин или H_2O_2 повышали активность Cu/Zn-СОД и Fe-СОД изоформ, но не влияли на Mn-изоформу (рис.б). В листьях и корнях оба фактора совместно также повышали активности Cu/Zn-СОД и Fe-СОД изоформ (рис.6а). Поскольку пролин возможно снижал содержание H_2O_2 , то при совместном действии этих веществ степень увеличения активностей двух изоформ была ниже, чем при действии факторов отдельно (рис.6а). Как показано выше, обработка Спм растений теллунгиеллы в контрольных условиях вызывала изменения в спектре изоформ СОД: в корнях увеличение активностей всех трех изоформ, в листьях снижение активностей Cu/Zn-СОД и Mn-СОД (рис. 6б). Следует отметить, что при использовании Спм в более высокой концентрации эти изменения были выражены сильнее. Это свидетельствовало о том, что повышение эндогенного содержания данного метаболита активировало процессы его метаболизации и, возможно, способствовало образованию АФК (в реакциях с участием полиаминоксидазы). Действие Спм совместно с H_2O_2 также изменяло активность изоформ СОД: в корнях повышалась активность Fe-СОД и Cu/Zn-СОД, но снижалась активность Mn-СОД; в листьях – повышалась активность Cu/Zn-СОД, незначительно снижались активности двух других изоформ (рис. 6б). Совместная обработка пролином и H_2O_2 , как показали наши исследования, вызывала в корнях и листьях появление трех дополнительных изоформ АП с молекулярной массой около 67

кДа (рис. 7а, б). В корнях в этом варианте исчезала одна из высокомолекулярных полос. Обработка Спм растений теллунгиеллы в контрольных условиях вызывала изменения в спектре изоформ АП и в корнях, и в листьях (рис. 8). При совместном действии Спм с H_2O_2 на растения теллунгиеллы в корнях исчезала высокомолекулярная изоформа, и появлялась низкомолекулярная, в листьях картина была схожа с действием только H_2O_2 (рис.8).

Таким образом, и Спм и пролин изменяли изоферментный состав АП и СОД у теллунгиеллы в контрольных условиях и при совместном действии с H_2O_2 . Влияние пролина на изоферментный состав СОД отмечен и у растений шалфея при совместном действии с UV-B облучением.

Оценка уровня мРНК генов изоформ СОД в листьях растений шалфея при совместном действии UV-B облучения и пролина. В связи с обнаруженным влиянием экзогенного пролина на активность изоформ СОД у растений шалфея (рис. 9) важно было установить, имеет ли место подобного рода регуляция на уровне мРНК генов, кодирующих изоформы СОД. Анализ уровня мРНК генов изоформ СОД у этого растения показал, что в листьях облученных UV-B растений, содержание мРНК гена *MSD* возрастало в 2,5 раза. Уровень мРНК *CSD* увеличивался в 3,5 раза. В отличие от уровня мРНК генов *MSD* и *CSD*, уровень мРНК гена *FSD* не изменялся. Анализ уровня мРНК генов трех изоформ СОД при совместном действии UV-B и пролина показал, что экзогенный пролин снимал стимулирующее действие UV-B на экспрессию гена *MSD* и уровень мРНК генов *MSD* в листьях шалфея не изменялся. Уровень мРНК гена *CSD* в листьях также как и при действии только UV-B облучения возрастал в 2,5 раза. Активность цитозольной изоформы Cu/Zn – СОД транзиторно увеличивалась в ответ на действие UV-B, что совпадало с интенсивным увеличением (в 3,0 – 3,5 раза) уровня мРНК *CSD* гена. Добавление пролина в питательную среду к растениям, подвергнутым UV-B облучению сопровождалось некоторым снижением содержания мРНК гена *CSD* и полным ингибированием стимулирующего эффекта ультрафиолета на активность Cu/Zn – СОД. Уровень мРНК гена *FSD* не изменялся ни при облучении, ни при совместном с пролином действии. Несмотря на это, растения отвечали на UV-B кратковременным ингибированием активности Fe-СОД. Пролин снимал вызванное UV-B ингибирование активности Fe-СОД в листьях растений и индуцировал появление двух новых изозимов (рис. 9), что могло быть связано с активацией их латентных форм.

Оценка уровня мРНК изоформ СОД и АП в корнях и листьях теллунгиеллы при совместном действии H_2O_2 и пролина или спермина. Для выявления возможного влияния пролина и Спм на транскрипционном уровне мы использовали известные для теллунгиеллы последовательности генов, кодирующих изоформы СОД: *CSD1* и *CSD2* для Cu/Zn СОД, *FeSD1* - для Fe-СОД, а также *MSD* - для MnСОД. Во всех вариантах опытов уровни мРНК генов *FeSD1* и *MSD* не изменялись ни в корнях, ни в листьях (рис. 10). Уровни мРНК генов *CSD1* и *CSD2* изменялись как при действии пролина, так и при действии пролина совместно с H_2O_2 . При действии Спм в корнях уровни экспрессии генов, кодирующих Cu/Zn – СОД изоформу (*CSD1* и *CSD2*), не изменялись. Однако в листьях происходило их увеличение (рис. 10). При действии Спм совместно с H_2O_2 также повышался уровень экспрессии обоих исследованных генов *CSD1* и *CSD2*, но только в листьях. Исходя из сравнительного анализа уровня мРНК генов и активностей изоформ СОД при действии пролина и Спм совместно со стрессором (рис. 8-10), можно предположить, что активность Fe-СОД регулируется на метаболическом уровне, что согласуется с данными полученными для шалфея.

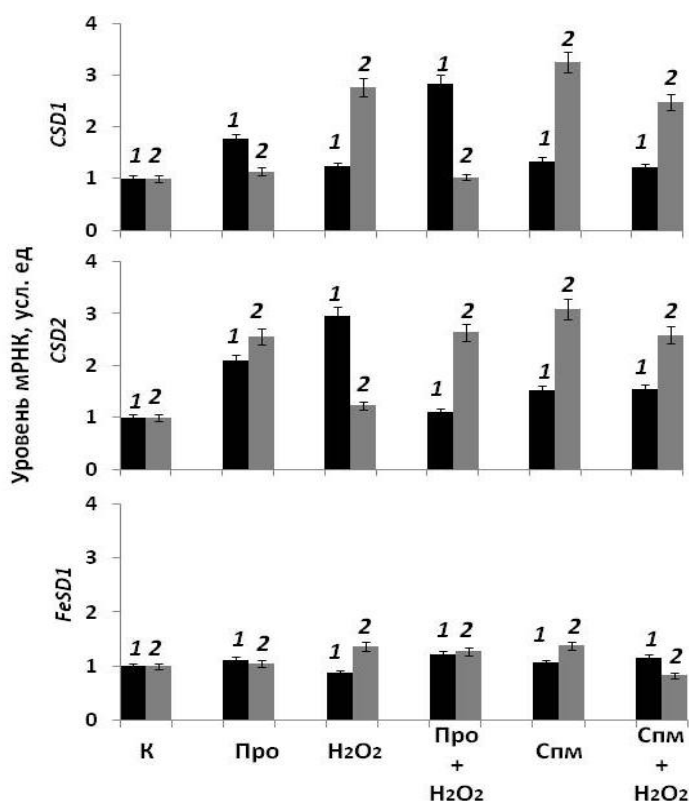


Рисунок 10. Уровень мРНК генов, кодирующих изоферменты СОД в растениях теллунгиеллы, при действии пролина и спермина, H_2O_2 , их совместном действии. 1– корни, 2 – листья. (Получено совместно с Корольковой Д.В.).

Незначительная активация Cu/ZnСОД при индукции экспрессии генов *CSD1* и *CSD2* может быть связана с различным вкладом активности каждого из изоферментов в общую активность данной изоформы, обнаруживаемую методом гель-электрофореза в нативных условиях.

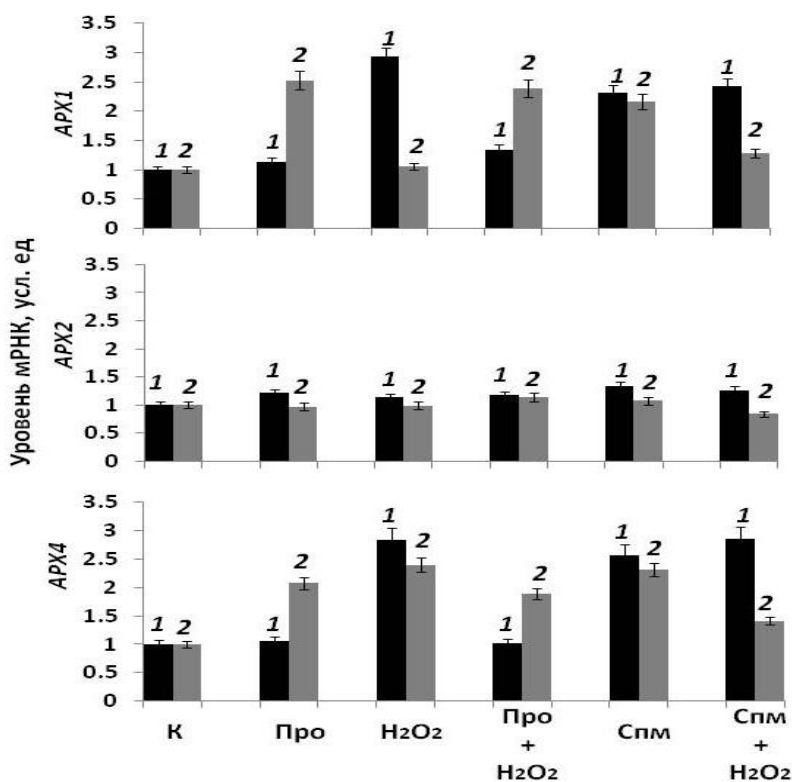


Рисунок 11. Сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих изоформы АП у растений теллунгиеллы при обработке пролином, Спм, H₂O₂, при их совместном действии. (Получено совместно с Сошинковой Т.Н., Корольковой Д.В.).

В ДНК растений теллунгиеллы нами были идентифицированы пять генов, кодирующих изоформы АП (*APX1*, *APX2*, *APX3*, *APX4*, *APX5*). Однако после проведения обратной транскрипции ПЦР была обнаружена экспрессия на уровне мРНК только двух генов, кодирующих цитозольные изоформы АП (*APX1*, *APX2*) и гена, кодирующего митохондриальную изоформу (*APX4*). Совместное действие H₂O₂ и пролина вызывало увеличение уровня мРНК гена *APX4*, кодирующего митохондриальную изоформу, и гена *APX1*, кодирующего цитозольную изоформу (рис. 11). Таким образом, при действии пролина и H₂O₂, пролин оказывал более заметное влияние как на активность изоформ СОД и АП, так и на уровень мРНК соответствующих генов. Пролин вызывал повышение уровней мРНК генов *APX1* и *APX4* в листьях, не влияя на таковой в корнях. H₂O₂ оказывал влияние на уровень мРНК этих генов в корнях и, в меньшей степени, в листьях. Совместное действие

двух исследуемых факторов на уровень мРНК генов *APX1* и *APX4* повторяло картину, характерную для пролина. Таким образом, пролин оказывал более сильное влияние на уровень мРНК, чем H_2O_2 . У теллунгииеллы при добавлении Спм в питательную среду и в листьях, и в корнях возрастал уровень мРНК генов *APX1* и *APX4* (рис.11). Однако не было отмечено достоверных изменений уровня мРНК гена *APX2* изоформы. При совместном действии Спм и H_2O_2 в корнях сохранялся повышенный уровень мРНК генов *APX1* и *APX4*, но не наблюдалось изменений для мРНК гена *APX2*. В листьях достоверные изменения наблюдались только для мРНК гена *APX4*. Таким образом, также как и на уровне белка, Спм совместно с H_2O_2 снижал стимулирующее действие данного стрессора на экспрессию генов, кодирующих изоформы АП.

Таким образом, и пролин, и Спм могут изменять функционирование антиоксидантных ферментов и при стрессе и в контрольных условиях. Это подтверждает обнаруженную дифференциацию в функционировании компонентов антиоксидантной системы у растений.

Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Образование АФК в растительной или животной клетке – это следствие существования организма в аэробной среде. В процессе эволюции растения сформировали весьма эффективную систему антиоксидантной защиты от избытка АФК. Уже беглого взгляда на разветвленную сеть и/или каскад антиоксидантных реакций достаточно, чтобы увидеть всю сложность координации такой системы. Несмотря на сложную организацию, система работает очень согласованно и защищает от повреждения белки, липиды мембран и нуклеиновые кислоты. АФК, кроме повреждения макромолекул, выполняют сигнальную роль в активации защиты от патогенной атаки, росте и развитии растений, клеточного цикла, программируемой клеточной смерти. Образование избытка АФК изменяет интенсивность экспрессии множества генов ответственных за биосинтез, как белков, так и низкомолекулярных метаболитов, выполняющих, в том числе, и защитные функции. В данной работе мы попытались ответить на вопрос, может ли антиоксидантная система играть роль общего неспецифического механизма, позволяющего растению противостоять кратковременному действию абиотических стрессоров. Использование растений, представляющих биомы двух климатических поясов, продемонстрировало сходство в функционировании

антиоксидантной защитной системы у всех исследованных растений. Используемые растения относятся к дикому типу, т.е. они не прошли направленной селекции (Вавилов, 1926). Выявленные при исследовании этих растений закономерности функционирования антиоксидантной системы при действии абиотических стрессоров, позволили нам сделать вывод, что ее активация, действительно, может быть общим неспецифическим защитным механизмом. С учетом опубликованных в литературе данных, можно считать, что этот механизм позволяет любому растению выживать при кратковременном действии абиотических стрессоров. Однако следует отметить, что активация одной конкретной антиоксидантной реакции не может эффективно защищать растение даже от кратковременного действия стрессоров. Поскольку образование АФК происходит в клетках растений и в нормальных условиях, был изучен конститутивный уровень как низкомолекулярных антиоксидантов, так и активностей антиоксидантных ферментов у опытных растений в контрольных условиях. Важным результатом оказалось обнаружение различий в конститутивном уровне компонентов антиоксидантной системы у этих растений. Так, растения на порядок различались по содержанию эндогенных пролина и индивидуальных ПА и других низкомолекулярных антиоксидантов и уровню общей активности СОД. Это указывает на то, что и в нормальных условиях вклад компонентов в антиоксидантную защиту не равнозначен и зависит от вида растения. Не равнозначность вклада компонентов антиоксидантной системы у растений еще больше усиливается в стрессорных условиях. Так при кратковременном действии засоления в растениях повышалось содержание пролина, каротиноидов, активировались свободная форма гваяколовых ПО, что указывает на большую эффективность этих реакций для преодоления негативных последствий в данных условиях. Кроме того, возможно эти реакции устойчивы к ингибированию при высоких эндогенных уровнях ионов натрия и хлора. Именно ингибированием отдельных изоформ можно объяснить незначительное повышение общей активности СОД у некоторых растений в условиях засоления, хотя этот фермент является уникальным в антиоксидантной защите и его функционирование необходимое условие ее эффективности. Возможно, ингибирующим эффектом засоления на уровне нативной структуры белков объясняется низкая активность каталазы. Можно также предположить, что отсутствие активации биосинтеза ПА путресцинового ряда в условиях засоления

связано с преимущественным использованием глутамата на биосинтез пролина, эффективность последнего в этих условиях хорошо показана для различных растений. При действии UV-B облучения на те же растения ведущую роль, наоборот, играли ПА (в частности, Пут) и их конъюгаты, а также антоцианы, флавоноиды, активировалась СОД и ПО, в меньшей степени, каталаза. При этом аккумуляции пролина не происходило. Следует отметить, что активация свободной формы гваяколовых ПО наблюдалось при действии двух исследованных стрессоров, что возможно связано с многообразием изоформ фермента. Полученные данные указывали на конкуренцию между усилением биосинтеза пролина и ПА: засоление стимулировало биосинтез пролина, но снижало образование ПА, облучение – наоборот, симулировало повышение содержания ПА, но не активировало биосинтез пролина. Кроме того, особенно четко избирательность в функционировании компонентов антиоксидантной защиты проявлялась между аккумуляцией пролина и активацией СОД. При последовательном действии двух стрессоров на растения базилика, полыни и чернушки такая дифференциация была выражена еще более заметно. Все полученные данные по функционированию СОД и аккумуляции пролина у опытных растений при действии засоления и UV-B облучения позволили выявить реципрокный характер между двумя этими метаболическими путями детоксикации АФК. Исследования влияния изучаемых стрессоров на экспрессию генов, кодирующих биосинтез ПА и изоформы СОД, были проведены на примере двух растений - подорожника и теллунгиеллы. Несмотря на дифференциацию в функционировании антиоксидантных реакций, и засоление и UV B облучение вызывали повышение уровня мРНК генов биосинтеза ПА в листьях теллунгиеллы и подорожника. Но при облучении это приводило к аккумуляции ПА за счет повышения содержания Пут, при засолении сопровождалось снижением уровня свободных ПА также за счет снижения содержания Пут. Возможным объяснением мы считаем участие полиаминоксидазы в регуляции уровня свободных индивидуальных ПА, как это было показано в нашей работе (Королькова и др., 2014). Кроме того, следует отметить, что при действии UV-B облучения на растения подорожника и теллунгиеллы происходило повышение содержания кадаверина, причем у подорожника в корнях и в листьях, а у теллунгиеллы только в листьях. Это еще раз доказывает, что ПА более эффективны при действии UV-B облучения, чем при засолении. Кроме того, следует отметить, что при UV-B

облучении активировался биосинтез фенольных соединений – антоцианов и флавоноидов. Поскольку биосинтез ПА и фенольных соединений связан, можно предположить, что повышение содержания ПА важно для активации биосинтеза фенольных соединений. Повышение уровня мРНК гена *CSD1* цитозольной изоформы СОД у растений теллунгиеллы и подорожника при засолении и облучении согласуется с литературными данными о стимуляции экспрессии этого гена АФК (Gechev, 2006; Miura and Tada, 2014). Но возможно регуляция активности изоформ СОД происходила как на уровне изменений в нативной структуре белка, так и на уровне активации латентных форм. Более того, ранее было показано, участие микроРНК - *mir398* в регуляции экспрессии гена *CSD1* у растений теллунгиеллы при засолении и облучении (Пашковский и др., 2010). Все это вместе демонстрирует сложную картину регуляции функционирования СОД у растений в стрессорных условиях. Тем не менее, данные об изменении уровня экспрессии генов биосинтеза ПА и цитозольной изоформы СОД свидетельствуют о существовании общих закономерностей в активации антиоксидантной системы при кратковременном действии изучаемых стрессоров.

Изменения в уровне экспрессии генов метаболизма пролина в условиях действия стрессоров, проведенное на примере теллунгиеллы, показало, что повышение уровня мРНК генов биосинтеза пролина согласуется с повышением его внутриклеточного содержания. Повышение интенсивности экспрессии генов биосинтеза пролина наблюдалось также при действии модуляторов ОС. Это согласуется с показанной нами, наряду с другими авторами, способностью пролина участвовать в нейтрализации АФК, замещая СОД или действуя наряду с ней (Сошинкова и др., 2013). Обнаруженная дифференциация в функционировании некоторых антиоксидантных реакций в условиях действия различных стрессоров вызвала необходимость исследовать влияние искусственного избытка низкомолекулярных антиоксидантов - пролина и Спм - на функционирование антиоксидантной системы растения. Данные, полученные на растениях шалфея и теллунгиеллы, контрастных по конститутивному уровню пролина, показали, что повышение содержания внутриклеточного пролина и спермина оказывает заметное влияние на активность СОД, АП, ПО, изоферментный состав этих ферментов, уровень мРНК генов, кодирующих эти изоформы. Для пролина это влияние различалось в зависимости от того, в нормальных и стрессорных условиях находилось растение. В стрессорных

условиях пролин проявлял антиоксидантные свойства, как в растениях шалфея, так и в растениях теллунгиеллы. Это проявлялось в снижении ОС, общих активностях СОД, АПО и ПО, появлении дополнительных изоформ СОД и АП, у шалфея наблюдалось повышение содержания Пут в листьях. В контрольных условиях выращивания растений теллунгиеллы экзогенный Спм, аналогично пролину, проявлял прооксидантные свойства. Об этом свидетельствовали изменения общей активности и изоферментного состава СОД, АП и гваяколовых ПО, увеличение в 2-3 раза уровней мРНК генов *CSD1* и *CSD2*, генов *APX1* и *APX4*. При ОС, индуцированном H_2O_2 , экзогенный спермин вовлекался в детоксикацию АФК также путем стимуляции активности изоформ СОД и АП и повышению интенсивности экспрессии указанных выше генов. Также экзогенный спермин вызывал повышение содержания Спд и пролина.

Антиоксидантные свойства пролина и ПА были подтверждены на растениях теллунгиеллы и шалфея при использовании другого модулятора ОС –PQ. С одной стороны, роль пролина и спермина как антиоксидантов можно объяснить их функционированием по типу шаперонов, стабилизирующих нативную структуру некоторых белков. С другой стороны, механизм антиоксидантного действия пролина и Спм можно связать с прямым «тушением» АФК, образовавшихся при стрессе. Это предположение вполне согласуется с химической структурой молекул как пролина, так и Спм. Молекула пролина содержит гидрированное пиррольное кольцо, для которого характерно участие в реакциях, связанных с передачей электронов. Кроме того, пролин способен образовывать устойчивый радикал, поскольку содержит третичный углеродный атом. Образование такого устойчивого радикала приводит к «тушению» или обрыву каскада свободно-радикальных реакций (Verslues and Shakma, 2010; Minosha et al., 2014). Кроме того, пролин способен и к окислению с разрывом пиррольного цикла и образованием лактонов, а также к окислению H_2O_2 с образованием окипролина, который был обнаружен нами при действии H_2O_2 , экзогенного пролина и их совместном действии на растения теллунгиеллы. Окисление пролина до окипролина демонстрирует прямое участие в детоксикации АФК, поскольку ферментативного окисления свободного пролина до окипролина в растениях и животных не известно. Кроме того, в отличие от низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата, токоферола, фенолов) пролин, как известно (Verslues and Shakma, 2010), легко транспортируется по растению, что, возможно, делает его

более конкурентноспособным по отношению к антиоксидантным ферментам, а также к другим низкомолекулярным антиоксидантам. Защитное действие Спм также объясняется химическими свойствами ПА как органических катионов. Они электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов, нуклеиновых кислот и с карбоксильными группами белков, а также ковалентно связываются с полипептидными цепями на этапе посттрансляционной модификации белков (Galston et al., 1997; Walden et al., 1997; Bouchereau et al., 1999; Kaur-Sawhney et al., 2003; Minosha et al., 2014). Таким образом, связывание индивидуальных ПА (и, в частности, Спм) с молекулами белков или нуклеиновых кислот способствует их защите от деградации, что объясняет участие Спм в защите ДНК от воздействия эндонуклеаз (Cohen, 1990; Nayyar, Chander, 2004; Minosha et al., 2014).

Однако пролин и, в меньшей степени, Спм могут вызывать увеличение содержания АФК в растениях в нормальных условиях. Прооксидантные свойства пролина можно связать с тем, что его расходование и восстановление необходимого внутриклеточного уровня сопряжено с функционированием «пролинового цикла», показанного ранее для животных клеток. (Кузнецов, Шевякова, 1999; Mittler, 2004; Полесская, 2007; Shao et al., 2008; Jimenez-Del-Rio et al., 2012; Miura and Tada, 2014). Это объясняет изменения в уровне мРНК генов метаболизма пролина у растений, как в нормальных, так и в стрессовых условиях выращивания, а также при совместном действии стрессоров и экзогенного пролина. Прооксидантные свойства Спм связаны со строгой регуляцией его содержания, а также уровня других индивидуальных ПА путресцинового ряда, полиаминоксидазой. Одним из продуктов этой реакции является H_2O_2 , который может активировать целый каскад окислительно-восстановительных реакций. Вне зависимости от механизмов, регулирующих внутриклеточный уровень пролина и Спм, эти метаболиты при экзогенном добавлении изменяют сбалансированный метаболизм клетки и нарушают протекание последовательных биохимических реакций. Это приводит к активации механизмов поддержания равновесия. Кроме того, пролин и ПА связаны общим предшественником глутаматом, расходование которого при активации того или другого биосинтеза, вызывает конкуренцию между этими метаболитами.

ВЫВОДЫ

1. Исследованные виды растений, принадлежащие к биомам двух климатических поясов, отвечают на кратковременное действие стрессоров (хлоридного засоления и UV-B облучения) стимуляцией функционирования антиоксидантной системы. Защитный эффект антиоксидантной системы определяется как активацией антиоксидантных ферментов, так и накоплением различных низкомолекулярных органических антиоксидантов, снижающих повреждающее действие стресс-факторов.
2. У растений, принадлежащих к биомам двух климатических поясов, наблюдается сходство в функционировании антиоксидантной системы. Различия, обусловленные условиями произрастания, отсутствуют.
3. Среди исследованных растений различных климатических группах присутствуют растения, характеризующиеся, например, высоким содержанием пролина, активности супероксиддисмутазы и высоким конститутивным уровнем индивидуальных полиаминов т.е. специфика функционирования антиоксидантной системы определяется видовой принадлежностью растения и природой действующего стрессорного фактора.
4. Избирательность функционирования того или иного компонента антиоксидантной системы в значительной степени зависит от природы действующего на растение стрессорного фактора. Так, у исследованных растений UV-B облучение индуцирует накопление полиаминов и антоцианов и активирует супероксиддисмутазу, но слабо влияет на содержание пролина. Напротив, хлоридное засоление индуцирует аккумуляцию пролина и каротиноидов, частично ингибирует активность супероксиддисмутазы и снижает содержание полиаминов и антоцианов. Наиболее ярко указанная специфика ответа растений на повреждающие факторы различной природы проявляется при последовательном действии указанных факторов на растения базилика, чернушки и полыни.
5. Между некоторыми антиоксидантными реакциями существуют выраженные реципрокные отношения, которые наиболее четко заметны между конститутивным уровнем пролина и активностью супероксиддисмутазы при действии засоления, UV-B облучения, а также при их последовательном действии.
6. Избирательное повышение содержания пролина или полиаминов у растений шалфея и теллунгиеллы при стрессе, вероятно, связано с конкуренцией реакций биосинтеза этих метаболитов за общий предшественник, в качестве которого

выступает глутамат. В пользу этого свидетельствует тот факт, что обработка экзогенным пролином растений шалфея в контрольных и стрессорных условиях увеличивает содержание путресцина, а обработка индивидуальными полиаминами тех же растений стабилизирует уровень пролина.

7. Низкомолекулярные метаболиты, пролин и спермин, вовлекаются в регуляцию функционирования антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза и аскорбатпероксидаза) в растениях теллунгиеллы и шалфея, что проявляется в активации пролином латентных изоформ супероксиддисмутаза и аскорбатпероксидаза, а также в изменении уровней мРНК, кодирующих эти изоформы генов. Все это может лежать в основе реципрокных отношений между содержанием пролина и активностью супероксиддисмутаза.

8. При искусственном повышении внутриклеточного содержания пролина и спермина у шалфея и теллунгиеллы, находящихся в контрольных условиях, спермин проявляет менее выраженные прооксидантные свойства по сравнению с пролином. Это может быть связано с существованием альтернативного механизма регуляции внутриклеточного уровня спермина за счет перехода свободной формы в конъюгированную и наоборот.

9. Повышение интенсивности экспрессии ключевых генов биосинтеза ПА у растений теллунгиеллы и подорожника наблюдалось как при действии хлоридного засоления, так и при UV-B облучении, тогда как увеличение содержания ПА имело место лишь при облучении. Это может быть связано с тем, что при засолении аккумуляция полиаминов лимитируется не уровнем мРНК ключевых ферментов биосинтеза, а определяется на посттранскрипционном, трансляционном или посттрансляционном уровнях.

10. Поскольку стресс-зависимая активация конкретных метаболических реакций клеточной антиоксидантной системы является множественной и видоспецифичной, важно учитывать: (1) – что результаты, полученные при использовании модельных растений, могут не в полной мере отражать механизмы функционирования антиоксидантной системы у других видов растений; (2) – что для создания трансгенных растений с эффективно функционирующей антиоксидантной системой целесообразно использовать два или несколько трансгенов, кодирующих компоненты антиоксидантной системы.

Список публикаций по теме диссертации

1. Ежова Т. А., Солдатова О. П., Мамонова Л. Б., Радюкина Н. Л., Софьин А. В., Кудрявцева Н. Н., Романов В.И., Шестаков С. В. Толерантные к норфлуразону мутанты *Arabidopsis thaliana* как объект изучения резистентности к окислительному стрессу// Физиология растений. –1997. – Т. 44. - С. 665-670
2. Ежова Т. А., Солдатова О. П., Мамонова Л. Б., Радюкина Н. Л., Софьин А. В., Кудрявцева Н. Н., Романов В.И., Шестаков С. В. Изучение активностей ферментов антиоксидантной системы в онтогенезе мутантов устойчивых к норфлуразону // Онтогенез. – 2000. - Т.31. - Р.40-46.
3. Лебедева О.В., Ежова Т.А., Мусин С.М., Радюкина Н.Л., Шестаков С.В. Ген PXD контролирует образование трех анионных пероксидаз *Arabidopsis thaliana* // Известия АН, серия биологическая. – 2003. - С. 178-187.
4. Soldatova O., Archelimonov A., Radukina N., Ezhova T., Shestakov S., Ziemann V., Hedtke B., Grimm B. An *Arabidopsis* mutant that is resistant to the protoporphyrinogen oxidase inhibitor acifluorfen shows regulatory changes in tetrapyrrole biosynthesis // Mol.Gen.Genomics. – 2005. – Vol. 273. - P. 311-318.
5. Карташов А.В., Иванов Ю.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Активация некоторых защитных систем в растениях *Thellungiella halophila* при действии NaCl // Известия ПГПУ. -2006. – Т. 5, №1. - С.57-61.
6. Радюкина Н.Л., Карташов А.В., Иванов Ю.В., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл. В. Сравнительный анализ функционирования защитных систем у представителей галофитной и гликофитной флоры в условиях засоления // Физиология растений. – 2007. - Т. 54. – С. 902-912.
7. Kuznetsov V. V., Radukina Nataliya L., Shevyakova Nina I. “Metabolism of polyamines and prospects for producing stress-tolerant plants”: An overview. In: Plant Stress and Biotechnology (Ch. 6) Ed. Devarajan Thangadurai, Bioscience Publications, 2007. - P. 213-256.
8. Карташов А. В., Радюкина Н. Л., Иванов Ю. В., Пашковский П. П., Шевякова Н. И., Кузнецов Вл. В. Роль антиоксидантных систем при адаптации дикорастущих видов растений к солевому шоку // Физиология растений. – 2008. - Т. 55, N 4. – С. 516-522.

9. Радюкина Н. Л., Шашукова А. В., Шевякова Н. И., Кузнецов Вл. В. Участие пролина в антиоксидантной защитной системе шалфея при действии NaCl и параквата // Физиология растений. – 2008. - Т.55, N 5. – С. 721-730.

10. Mapelli S., Brambilla I. M., Radyukina N. L., Ivanov Yu. V., Kartashov A. V., Reggiani R., Kuznetsov Vl. V. Free and bound polyamines changes in different plants as a consequence of uv-b light irradiation // Gen. Appl. Plant. Physiol. (Special Issue). – 2008. - Vol. 34. - P. 55-56.

11. Радюкина Н.Л., Мапелли С., Иванов Ю.В., Карташов А.В., Брамбилла И., Кузнецов Вл.В. Гомеостаз полиаминов и антиоксидантные системы корней и листьев *Plantago major* при солевом стрессе // Физиология растений. – 2009. - Т. 56. - С. 359-368.

12. Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Мапелли С., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Пролин регулирует уровень полиаминов в растениях шалфея в нормальных условиях и при УФ-В облучении // Физиология растений. - 2010. - Т. 57. - С. 422-429.

13. Тоайма В.И.М., Радюкина Н.Л., Дмитриева Г.А., Кузнецов Вл.В. Участие антиоксидантной защитной системы базилика в кросс-адаптации при комплексном действии UV-B и засоления // Вестник РУДН. - 2010. - Т. 14. - С 123-127.

14. Пашковский П.П., Рязанский С.С., Радюкина Н.Л., Гвоздев В.А., Кузнецов Вл.В. МИР398 и регуляция экспрессии гена цитоплазматической Cu/Zn SOD в растениях *Thellungiella halophila* в условиях стресса // Физиология растений. - 2010. - Т. 57. - С. 756–767.

15. Радюкина Н. Л., Шашукова А. В., Макарова С. С., Кузнецов Вл. В. Экзогенный пролин модифицирует дифференциальную экспрессию генов супероксиддисмутазы в растениях шалфея при UV-B облучении // Физиология растений. - 2011. - Т. 58. - С.49-57.

16. Парфенов И.А., Ревина Т.А., Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Валуева Т.А. Фрагмент гена, кодирующего белок-ингибитор химотрипсина и трипсина в картофеле // Прикладная биохимия и микробиология. - 2011. - Т. 47, - С.402-407.

17.Radyukina N.L., Ivanov Yu.V., Kartashov A.V., Pashkovskiy P.P., Shevyakova N.I., Kuznetsov V.I.V. Regulation of gene expression governing proline metabolism in *Thellungiella salsuginea* by NaCl and paraquat // Физиология растений. - 2011. - Т. 58. – С. 558-567.

18.Радюкина Н. Л., Шашукова А. В., Мапелли С, Сошинкова Т. Н. Влияние экзогенных полиаминов на содержание пролина и эндогенных свободных и конъюгированных полиаминов растений шалфея в условиях окислительного стресса // Физиология растений. - 2011. - Т. 58. – С. 673-680.

19.Пашковский П.П., Радюкина Н.Л. МикроРНК и регуляция экспрессии генов Cu/Zn-СОД в растении *Thellungiella salsuginea* при действии различных концентраций меди // Вестник Томского государственного университета. - 2011. - Т. 15. - С. 147-151.

20.Радюкина Н.Л., Тоайма В., Зарипова Н.Р., Кузнецов Вл.В. Участие низкомолекулярных антиоксидантов в кросс адаптации лекарственных растений к последовательному действию UV_В облучения и засоления // Физиология растений. - 2012. - Т. 59. - С.1-9.

21.Радюкина Н.Л., Тоайма В., Зарипова Н.Р., Кузнецов Вл.В. Влияние последовательного действия UV-В облучения и засоления на динамику содержания фенольных соединений в растениях различных экофизиологических групп. Сборник материалов докладов VIII Между народного симпозиума. - М, 2012. - С. 434-439.

22.Сошинкова Т. Н., Радюкина Н. Л., Королькова Д. В., Носов А. В. Проллин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе // Физиология растений. - 2013. - Т.60. - С. 47- 60.

23.Iori V., Pietrini F., Cheremisina A., Shevyakova Nina I., Radyukina N., Kuznetsov Vladimir V., Zacchini M. Growth Responses, Metal Accumulation and Phytoremoval Capability in Amaranthus Plants Exposed to Nickel Under Hydroponics // Water Air Soil Pollution. - 2013. - DOI 10.1007/s11270-013-1450-3.

24.Королькова Д.В., Радюкина Н.Л., Сошинкова Т.Н., Мапелли С., Кузнецова Вл.В. Влияние экзогенного спермина на функционирование антиоксидантной

системы растений *Thellungiella salsuginea* // Физиология растений. - 2014. - Т.61. - С. 69- 76.

25.Pietrini F., Iori V., Cheremisina A., Shevyakova N. I., Radyukina N., Kuznetsov Vl. V., Zacchini M. Evaluation of nickel tolerance in amaranthus paniculatus l.plants by measuring photosynthesis, oxidative status,antioxidative response and metal-binding molecule content // Environ Sci Pollut Res. – 2015. - Vol. 22. – P. 482 – 494