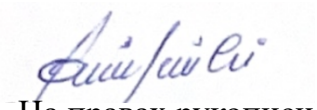

На правах рукописи

Флорес Каро Орландо де Хесус

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА СУКЦИНАТА В ЛИСТЬЯХ *Zea mays L.* И *Triticum aestivum L.* ПРИ АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ НА СОЛЕВОЙ СТРЕСС

Специальность 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор **Епринцев Александр Трофимович**

Официальные оппоненты:
Боровский Геннадий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук.

Лисов Александр Викторович, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «24» декабря 2024 г. В 12:00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.138.01 по специальности 1.5.21. – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу:127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 678 54 20, электронная почта: aicheremisina@mail.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, г. Москва и на сайте https://ippras.ru/.

Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Иванова Александра Игоревна

Актуальность темы. Одной из органических молекул, имеющих фундаментальное значение в модуляции адаптивного ответа растений на внешние стрессовые факторы, является сукцинат (Saha *et al*., 2012, Bandehagh, Taylor, 2020). Этот интермедиат на ранних стадиях развития растений также синтезируется из жирных кислот посредством глиоксилатного цикла в глиоксисомах и впоследствии используется в ЦТК для биосинтеза аминокислот и оксалоацетата для глюконеогенеза (Das *et al*., 2012). В высших растениях сукцинат накапливается в клетках в условиях стресса вследствие активации «солевого дыхания» (Robertson, Wilkins, 1948), обуславливающего окислительно-восстановительный баланс в митохондриях и синтезом активных форм кислорода (Schwarzländer *et al*., 2009). Интенсификация окисления данного интермедиата, дающего возможность синтеза АТФ в органоидах, является одной из важнейших характеристик первичной реакции на стресс. Янтарная кислота окисляется с помощью фермента сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.5.1), также называемого сукцинат-убихинон-оксидоредуктазой, обуславливающего важную роль в регуляции цикла трикарбоновых кислот, альтернативный вариант–ГАМК-шунт и окислительное фосфорилирование (Eprintsev *et al*., 2021, Che-Othman *et al*., 2020).

Особый интерес представляет понимание изменений состава и кинетических свойств изоферментов СДГ, а также механизмов регуляции их ферментативной активности на биохимическом, молекулярном, и эпигенетическом уровнях (Moosavi *et al*., 2020). Эти регуляторные аспекты СДГ широко изучались на клетках человека, животных, бактерий и дрожжей. Однако, у растений с разным типом метаболизма данные механизмы еще далеки от полного понимания и необходимы дальнейшие исследования для выяснения координации различных путей регуляции СДГ в условиях абиотического стресса. Поскольку СДГ является ключевым ферментом, участвующим в углеродном обмене и клеточном дыхании, представляется целесообразным изучить влияние солевого стресса на регуляцию функционирования сукцинатдегидрогеназы.

Цель и задачи. Целью данной работы являлось изучение изменения биохимических и молекулярных аспектов функционирования фермента сукцинатдегидрогеназы и сукцинат-оксидазной системы в листьях растений С3 и С4 типа при кратковременом солевом стрессе.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить высокоочищенные препараты СДГ из листьев кукурузы и пшеницы и изучить влияние солевого стресса на некоторые кинетические свойства очищенных изоферментов;
2. Оценить работу сукцинат-оксидазной системы в митохондриальном дыхании и ее зависимость от окисления сукцината в условиях солевого стресса;
3. Определить биохимические аспекты функционирования СДГ в растениях (*Zea mays L., Triticum aestivum L.*) *in vivo* в условиях действия солевого стресса;

4. Выявить зависимость активности СДГ и уровня транскриптов генов, кодирующих ее субъединицы, в листьях кукурузы и пшеницы при засолении;
5. Проанализировать промоторную область генов СДГ и определить наличие сайтов связывания факторов транскрипции, регулирующих их при засолении;
6. Исследовать роль метилирования CG-динуклеотидов промотора в регуляции транскрипции генов СДГ в условиях засоления в листьях кукурузы.

Научная новизна и значимость работы. Получение гомогенных препаратов изоферментов СДГ в высокоочищенном состоянии из листьев растений позволило выявить различия их кинетических свойств, обусловленные засолением.

Установлено, что изменения ферментативной активности СДГ и сукцинат-оксидазной системы в условиях солевого стресса позволили оценить функциональность биоэнергетического клеточного метаболизма и митохондриального дыхания растений, стимулируемых в рамках адаптивного ответа к факторам стресса. Сравнительный анализ метильного статуса промоторов и относительных уровней экспрессии генов, кодирующих субъединицы СДГ кукурузы, в условиях засоления показал определенную зависимость. Установлено, что гены *ZmSDH2-3*, *ZmSDH3-1* и *ZmSDH4* регулируются посредством эпигенетического механизма, за исключением гена, кодирующего флавопротеиновую субъединицу.

Анализ нуклеотидных последовательностей промоторной области генов СДГ кукурузы и пшеницы позволил установить наличие цис-регуляторных элементов, соответствующих семействам транскрипционных факторов bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2/ARF и ERF, участвующих в регуляции при абиотическом стрессе. Обнаружено, что динамика активности генов, кодирующих СДГ как у кукурузы, так и у пшеницы, может быть коррелирована с наличием сайтов связывания специализированных солезависимых факторов транскрипции типа WRKY и NAC.

Практическая значимость. Исследования роли СДГ в адаптации растений к стрессовым условиям важны не только для развития теоретической науки, но и для разработки программ биотехнологии модифицированных растений, более устойчивых к различным видам стресса, включая засоление.

Полученные высокоочищенные гомогенные препараты СДГ можно использовать в качестве модельных образцов при сравнительном анализе других ферментативных систем. Результаты изучения их кинетических свойств, обусловленные засоленностью, позволяют анализировать изменения их молекулярной структуры для синтеза более эффективных энзимов.

Обнаруженные особенности динамики экспрессии генов, регулируемых эпигенетическими механизмами, такими как метилирование промотора, позволяют разработать методы управления функциями определенных генов, улучшающих адаптивную способность растений в условиях стресса.

Выявленные механизмы метаболической регуляции скорости митохондриального дыхания через сукцинат-оксидазную систему в растительной

клетке позволяют изучить возможность использования экзогенных соединений, улучшающих продуктивность сельскохозяйственных культур в условиях засоления.

Полученные результаты могут служить основой для последующих научных исследований обучающихся, а также использоваться для учебного процесса по биохимии, энзимологии, физиологии растений и молекулярной биологии.

Положения, выносимые на защиту.

1. В листьях кукурузы и пшеницы обнаружены два разных изофермента сукцинатдегидрогеназы. Установлены различия в некоторых кинетических и регуляторных свойствах изоферментов СДГ в условиях засоления. Наблюдаемые различия свидетельствуют об изменениях на биохимическом уровне изученных изоферментов в рамках адаптации клеточного метаболизма в условиях стресса.
2. Солевой стресс стимулирует каталитическую активность СДГ, интенсивность митохондриального дыхания и активирует функционирование альтернативного оксидазного пути и ГАМК-шунта. Регуляция активности и состава белка СДГ, при солевом стрессе происходит за счет изменения экспрессии генов, кодирующих его субъединицы.
3. Наличие сайтов *w-box* и NAC в промоторной области генов, кодирующих СДГ, может играть важную роль в типе регуляции активности изучаемых генов посредством транскрипционных факторов WRKY и NAC при адаптации растительных клеток к солевому стрессу.
4. Установлено, что гены *ZmSDH2-3*, *ZmSDH3-2*, *ZmSDH4* регулируются эпигенетическими механизмами, такими как метилирование их промоторов. Выявлены изменения метильного статуса CpG-динуклеотидов исследованных генов в первые шесть часов солевого стресса.

Апробация работы. Материалы диссертации прошли апробацию на общероссийских и международных конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2021); Годичное собрание Общества физиологов растений России: Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий» (Нижний Новгород, 27 - 30 сентября 2022 г.); VII Международная научная конференция «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений» PlantGen (Казань, 10-15 июля 2023 г.); Межрегиональных конференциях «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» (Воронеж, 2020-2024); ежегодных научных сессиях Воронежского госуниверситета (2022, 2024).

Публикации. Основные результаты настоящей работы изложены в 14 публикациях – тезисах и статьях, среди которых 5 статей опубликованы в журналах, включенных в список ВАК, и индексированы в Web of Science и Scopus.

Структура и объём работы: Диссертация изложена на 127 страницах основного текста и состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы (202 источника). Иллюстрационный материал включает 28 рисунков и 7 таблиц.

Список принятых сокращений: СДГ – сукцинатдегидрогеназа; АОП – альтернативный оксидазный путь; АФК – активные формы кислорода; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ТФ – транскрипционный фактор; ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол; ФМС – феназинметасульфат; ЭГТА – этиленгуанинтетраацетат.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В качестве объектов исследования использовали 14-дневные листья проростков кукурузы (С4-*Zea mays L.*) сорт Воронежская 76 и пшеницы (С3-*Triticum aestivum L.*) сорт Галина. Растения выращивали гидропонным способом при температуре 25°С и 12-часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м^2.

Моделирование солевого стресса. Солевой стресс моделировали инкубацией проростков в 150 мМ растворе NaCl; контрольные растения выращивали в воде. Первый отбор образцов проводился перед инкубацией, а следующие отборы брались через 6, 12 и 24 ч. воздействия.

Активность СДГ определяли спектрофотометрически при 600 нм, при pH 7,8 и 25ºС. В качестве акцептора электронов был использован ДХФИФ (Popov *et al*., 2011).

Определение активности сукцинат-оксидазной системы осуществляли по поглощению кислорода в зависимости от окисления сукцината с помощью поляриметрического метода (Jacoby *et al*., 2015, Van de Venter, 1985).

Определение активности АОП проводили поляриметрически при 25ºС и 1 атм., путём регистрации поглощенного O_2, с помощью KCN в качестве ингибитора комплекса IV.

Очистка изоферментов СДГ выполнялась при +4°С по многостадийной схеме: гомогенизация, фракционирование белка $NH_4(SO_4)_2$ (до 60% насыщения), гель-фильтрация через сефадекс G25 и ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel. Десорбцию осуществляли линейным градиентом KCl от 30 до 240 мМ.

Определение изоферментного состава СДГ проводили электрофорезом в полиакриламидном геле (Davis, 1964). Специфическое проявление СДГ осуществляли тетразолиевым методом.

Выделение ДНК проводили с помощью СТАБ (Aboul-Maaty, Oraby, 2019).

Модификация ДНК осуществлялась с помощью $NaHSO_3$. (Darst *et al*., 2020).

Суммарная клеточная РНК выделялась экстракцией фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом. В качестве осадителя использовали LiCl (Vennapusa *et al*., 2020).

ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler96 («Roche», Solna, Швеция) с использованием SYBR Green I в качестве интеркалирующего красителя.

Анализ промоторных областей генов СДГ на наличие CpG-островков и подбор праймеров для метил-специфичной ПЦР проводили с помощью программы MethPrimer (Li, Dahiya, 2022) (http://www.urogene.org/methprimer/index1.html).

Проведение метил-специфичной ПЦР осуществляли с применением набора реактивов ScreenMix («Евроген», Москва, Россия), в качестве матрицы использовали ДНК, модифицированную бисульфитом.

Анализ промоторов генов СДГ на наличие сайтов связывания транскрипционных факторов проводили с помощью базы данных факторов транскрипции растений PlantRegMap/PlantTFDB v5,0. (https://planttfdb.gao-lab.org/).

Статистическая обработка данных. Все опыты проводились в 3-х биологических повторностях. Статистическую обработку осуществляли с использованием критерия Стьюдента с помощью программы Excel 2019 и Jamovi версии 2.5.4. Влияние фактора достоверно при $p \leq 0.05$ (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние солевого стресса на функционирование сукцинатдегидрогеназы. Анализ динамики каталитической активности СДГ в митохондриях из листьев кукурузы показал, что при концентрации NaCl от 50 до 150 мМ наблюдалось постепенное увеличение активности фермента, достигающее максимума при 150 мМ NaCl. Возрастание активности изучаемого фермента составило 35,48% по сравнению с контрольным вариантом. Влияние NaCl на активность СДГ в митохондриях из листьев пшеницы, также проявляло аналогичную тенденцию, с увеличением общей активности на 21,58% при 100 мМ NaCl по сравнению с контролем.

Небольшое повышение концентрации NaCl в среде с изолированными митохондриями вызывало различное увеличение активности СДГ в зависимости от вида растения. Это может быть связано с воздействием анионов Cl^- на аминокислотные остатки СДГ или изменением состояния митохондрий (Kearney *et al*., 1974).

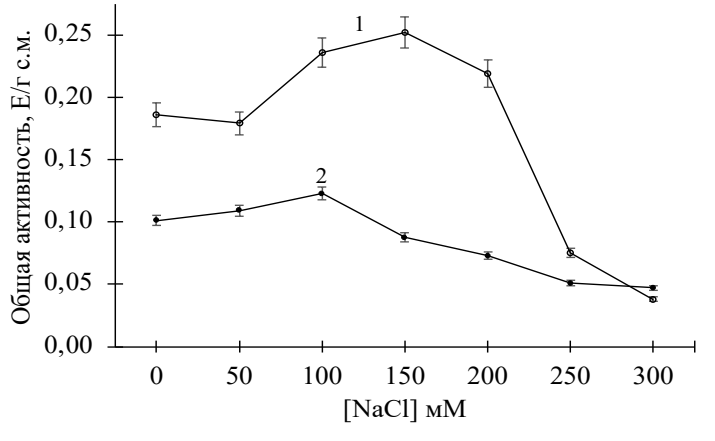

Рис. 1. Общая активность сукцинатдегидрогеназы в митохондриях листьев кукурузы (1) и пшеницы (2) при действии разных концентраций NaCl.

Очистка изоферментов СДГ и изучение их кинетических характеристик. Проводилась многостадийная очистка фермента СДГ из листьев кукурузы и пшеницы в условиях солевого стресса и были получены его высокоочищенные изоферменты. Очистка включала гомогенизацию, осаждение белка $NH_4(SO_4)_2$, гель-фильтрацию и ионообменную хроматографию. Из кукурузы в контрольных условиях удельная активность СДГ1 составила 1.035 Е/мг, СДГ2 — 1.095 Е/мг. В условиях засоления изофермент СДГ1 был очищен до удельной активности 0.623 Е/мг, а СДГ2 — 1.095 Е/мг (Табл. 1). Для пшеницы в контроле удельная активность СДГ1 составила 3.727 Е/мг, СДГ2 — 2.969 Е/мг. При засолении значение этого показателя СДГ1 было 2.488 Е/мг, СДГ2 — 3.282 Е/мг (Табл. 1).

Таблица 1

Очистка СДГ из листьев кукурузы (Епринцев *et al*., 2022) и пшеницы (n = 3, p < 0.05)

Изофермент	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
СДГ1 $_{\text{Контроль кукурузы}}$	0,085	0,088	1,035	20,71	76,54
СДГ1 $_{\text{Контроль пшеницы}}$	0,06	0,246	3,727	33,29	79,08
СДГ2 $_{\text{Контроль кукурузы}}$	0,074	0,081	1,095	19,06	80,92
СДГ2 $_{\text{Контроль пшеницы}}$	0,09	0,285	2,969	38,57	62,99
СДГ1 $_{\text{24 ч NaCl кукурузы}}$	0,154	0,096	0,623	15,36	41,15
СДГ1 $_{\text{24 ч NaCl пшеницы}}$	0,082	0,204	2,488	31,53	53,74
СДГ2 $_{\text{24 ч NaCl кукурузы}}$	0,095	0,104	1,095	16,64	72,26
СДГ2 $_{\text{24 ч NaCl пшеницы}}$	0,078	0,256	3,282	39,57	70,90

ПААГ-электрофорез подтвердил гомогенность изоферментов, выявив одну белковую полосу для каждого образца. Специфическое окрашивание обнаружило активность изоферментов СДГ с Rf = 0.34 для СДГ1 и 0.23 для СДГ2 в кукурузе, и 0.26 для СДГ1 и 0.36 для СДГ2 в пшенице.

Определение pH-оптимума изоферментов сукцинатдегидрогеназы. Были определены оптимальные значения pH для изоферментов СДГ из листьев проростков кукурузы и пшеницы. Для СДГ1 из кукурузы максимальная активность наблюдалась при pH 7.6, независимо от солевого стресса. Для СДГ1 из пшеницы оптимальное pH было 7.4. Значение pH-оптимума для СДГ2 из кукурузы снизилось с 8.0 до 7.8 после солевого стресса. Для СДГ2 из пшеницы оптимальное pH осталось 7.8. Изменение pH митохондриального матрикса под воздействием солевого стресса влияет на скорость окислительного фосфорилирования, синтез АТФ и конформационные состояния белков дыхательной цепи, включая СДГ.

Изоферменты СДГ из листьев кукурузы и пшеницы имели сходные кинетические свойства как при солевом стрессе, так и в контрольных условиях. Константа Михаэлиса (K_M) для СДГ1 из кукурузы составила 1.08 мМ в контроле и 1.13 мМ при

стрессе. Для пшеницы СДГ1 значения K_M составили 1.02 мМ и 1.17 мМ соответственно, что указывает на определенные различия. K_M для СДГ2 из кукурузы составила 1.18 мМ в контроле и 1.23 мМ в опыте. Для СДГ2 из пшеницы K_M увеличилась с 1.23 мМ до 1.29 мМ при солевом стрессе.

Максимальная скорость реакции (V_{max}) для изоферментов из кукурузы возросла в экспериментальных растениях на 17% (СДГ1) и 27% (СДГ2). V_{max} для СДГ1 из пшеницы оставалась стабильной, тогда как для СДГ2 увеличилась в 1.80 раза у пшеницы, подвергнутой воздействию NaCl. Значения V_{max}/K_M для контрольных СДГ1 и СДГ2 из кукурузы были на 11.1% и 16.7% ниже, чем при стрессе, указывая на более высокое сродство к субстрату. V_{max}/K_M для СДГ1 из пшеницы была в 0.83 раза выше, а для СДГ2 в 1.73 раза ниже в контрольных образцах по сравнению с опытными.

Влияние засоления на митохондриальное дыхание и активность сукцинат-оксидазы. Исследование митохондриального дыхания, зависимого от окисления сукцината, в условиях кратковременного солевого стресса выявило значительные изменения. Показано увеличение активности сукцинат-оксидазной системы в митохондриях проростков кукурузы и пшеницы, инкубированных в 150 мМ NaCl в течение 24 часов (рис.2). В первые 6 часов не наблюдалось значительных изменений, но через 12 часов отмечен рост дыхательной активности митохондрий на 9,45%. В конце 24-часового периода в митохондриях листьев кукурузы потребление кислорода увеличилось на 68,77% по сравнению с контролем, где этот показатель составил 24,28%, что привело к повышению дыхательной активности на 35,80% (Рис. 2а). В митохондриях листьев пшеницы сукцинат-зависимое дыхание увеличилось на 55,9% в первые 6 часов по сравнению с образцами, инкубированными в воде, затем медленно снизилось на 13,5% к 12 часам. Максимальная активность сукцинат-оксидазной системы наблюдалась через 24 часа, увеличившись в 2,34 раза по сравнению с контролем (Рис. 2б). Эти результаты показывают различное воздействие солевого стресса на окисление сукцината и митохондриальное дыхание в листьях растений.

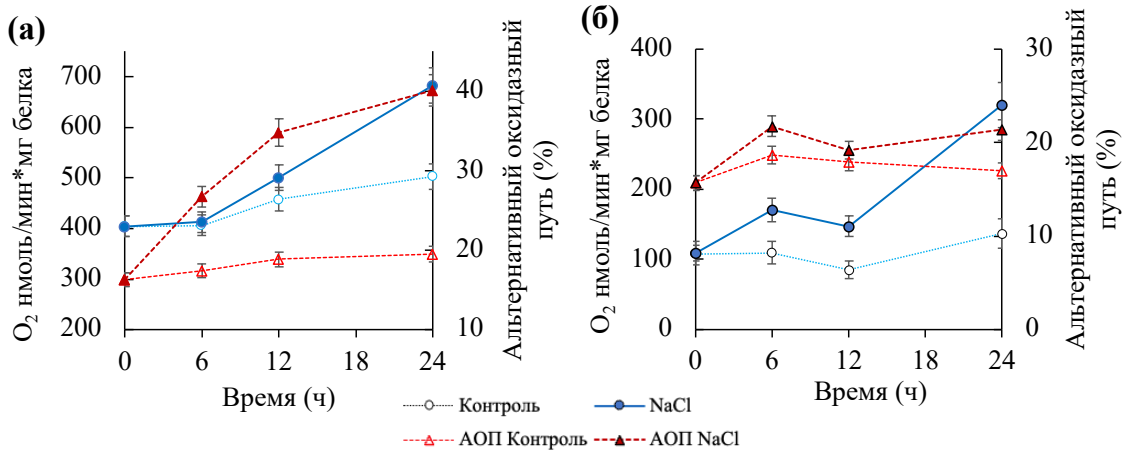

Рис. 2. Активность сукцинат-оксидазной системы и альтернативного пути в митохондриях, выделенных из листьев кукурузы (а) (Fedorin *et al*., 2022) и пшеницы (б)

Повышение скорости окисления сукцината может быть связано с увеличением потока электронов через электрон-транспортную цепь из-за изменений электрохимического градиента, вызванных стимуляцией активности АТФ-синтазы NaCl (Tran *et al*., 2020). Более высокие скорости потребления кислорода наблюдались в митохондриях пшеницы, что позволило предположить, что адаптивная реакция у растений с метаболизмом С3-типа требует более высокой активности сукцинат-оксидазной системы для нормального функционирования митохондриальной дыхательной цепи в условиях солевого стресса.

Изучение активности АОП показало значительные различия в митохондриях кукурузы и пшеницы. В присутствии ионов Na^+ и Cl^- активность АОП увеличилась на 40,13% в кукурузе и на 21,34% в пшенице после 24 часов. Это указывает на то, что растения могут использовать АОП как часть адаптивного ответа на засоление, минимизируя синтез активных форм кислорода и азота, что важно для регуляции окислительного стресса (Jacoby *et al*., 2016, Manbir *et al*., 2022).

Изменение активности СДГ в условиях засоления *in vivo.* Было изучено влияние солевого стресса на функционирование СДГ *in vivo*. Показано, что данный вид стресса оказывает стимулирующий эффект на каталитическую активность фермента СДГ у изучаемых видов растений (Рис 3). В листьях кукурузы активность фермента оставалась стабильной в первые 12 часов инкубации в NaCl. В последующие 12 часов эксперимента активность СДГ увеличилась на 51,34%, что соответствует возрастанию скорости окисления сукцината изолированными митохондриями (Рис. 3а). У пшеницы активность СДГ увеличилась на 68,9% в первые 6 часов эксперимента. После 12 часов изменений не наблюдалось, но через 24 часа активность СДГ удвоилась по сравнению с контролем (Рис. 3б).

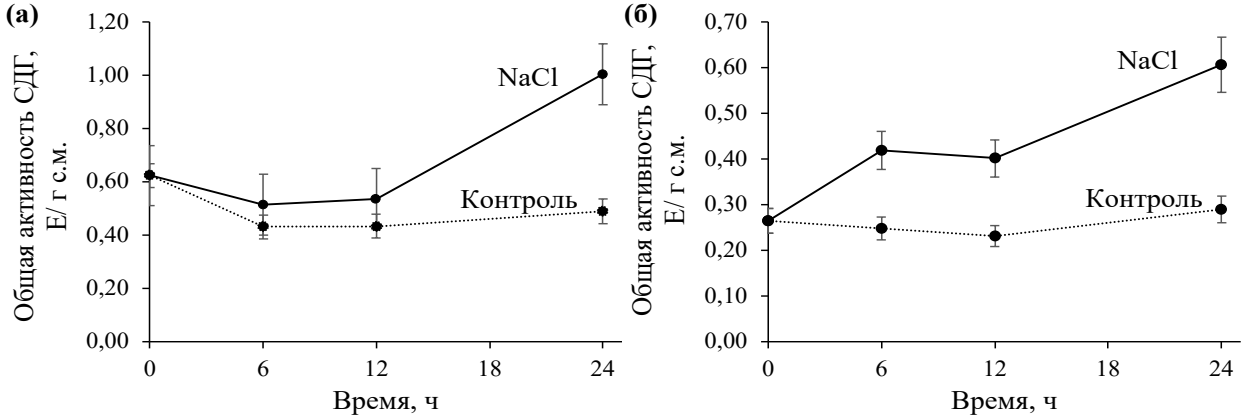

Рис. 3. Динамика активности сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы (а) (Fedorin *et al*., 2022) и пшеницы (б) при засолении.

Влияние солевого стресса на регуляцию экспрессии генов СДГ.

Было установлено, что инкубация проростков *Zea mays* и *Triticum aestivum* в растворе NaCl приводит к увеличению активности СДГ и митохондриального

дыхания в течение первых двадцати четырех часов стрессового воздействия. В связи с этим, важно было выяснить механизмы, регулирующие активность данного фермента.

При исследовании влияния солевого стресса на уровень транскриптов гена, кодирующего СДГ1, было выявлено, что данный показатель проявляет определенную тенденцию у кукурузы: в условиях солевого стресса происходит постепенное увеличение его значения с 1,25 ед. в первые шесть часов инкубации в NaCl до 3,06 ед. через 24 ч воздействия по отношению к контрольному варианту (Рис. 4а). Следовательно, наблюдаемое увеличение концентрации мРНК гена *ZmSDH1-2* согласуется с повышением общей активности СДГ в листьях кукурузы. Каталитический центр белкового комплекса содержится в первой субъединице, что может объяснить прямую связь между активностью этого гена и увеличением каталитической скорости фермента. Данная картина также соответствует динамике экспрессии гена *TaSDH1* пшеницы. Увеличение относительного уровня транскриптов этого гена наблюдалось уже с первых шести часов воздействия солевого раствора. При этом данный показатель увеличился в 5,47 раз.

В дальнейшем, концентрация транскриптов гена *TaSDH1* снизилась, достигнув минимума к 12 часу эксперимента и составив 3,84 единицы, оставаясь выше уровня, выявленного в контрольных образцах. К 24 часам инкубации растений пшеницы, транскрипционная активность *TaSDH1* значительно возросла, достигая максимума 8,27 ед. по сравнению с контролем (Рис. 4б). Хотя наблюдается общая тенденция к увеличению, между относительным уровнем экспрессии генов *ZmSDH1-2* и *TaSDH1*, на протяжении всего экспериментального периода существуют некоторые различия.

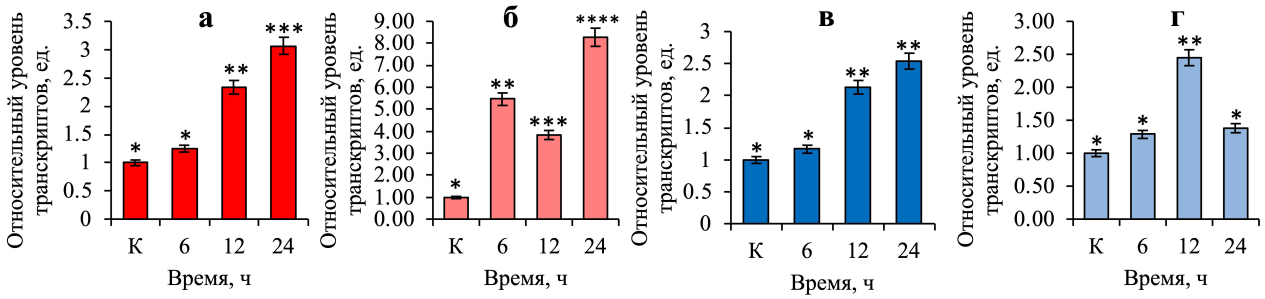

Рис. 4. Уровень транскриптов генов (а) *ZmSDH1-2*, (б) *TaSDH1*, (в) *ZmSDH2-3*, и (г) *TaSDH2* в листьях кукурузы и пшеницы при действии NaCl. К – контроль.

Важно отметить, что активность исследуемого гена у кукурузы проявляет тенденцию к постепенному увеличению, в отличие от общей активности гена *TaSDH1*, которая значительно выше в первые 6 часов и через 24 часа по отношению к данным, полученным из *Zea mays*. Отмеченные различия указывают на более быструю активацию данного гена у пшеницы, по сравнению с геном *SDH1-2* у кукурузы. Отличия, вероятно, обусловлены разной чувствительностью к солевому

стрессу и быстротой реакции в зависимости от типа растения и его метаболизма (Sheen, 1990).

Изучение величины содержания транскриптов гена *ZmSDH2-3*, кодирующего субъединицу СДГ2 в листьях кукурузы в условиях солевого стресса показало, что анализируемый показатель изменяется с тенденцией, аналогичной наблюдаемой в уровнях транскрипции гена *ZmSDH1-2*. В первые 6 часов существенных изменений не происходит и значения остаются близкими к полученным в контрольных пробах. Однако, после 12 часов воздействия активность изучаемого гена увеличивается на 2,13 единицы. К концу экспериментального периода уровни транскрипции достигли максимального значения, увеличившись на 2,53 единицы (Рис. 4в).

На протяжении всего экспериментального периода обнаружено вариационное повышение активности гена *TaSDH2*, вызванное солевым стрессом (Рис. 4г). В отличие от данных, полученных по относительным уровням транскрипции *ZmSDH2-3*, где наблюдается постепенное увеличение с максимальными значениями через 24 часа, для *TaSDH2* аналогичная тенденция не установлена. На шестом часу инкубации в NaCl концентрация мРНК исследуемого гена оставалась стабильной. Однако, уже через 12 часов этот показатель установился на уровне 2,45 единиц. К 24 часам воздействия стрессовых условий активность гена снизилась до значений, близких к контрольным образцам.

Экспрессия генов, кодирующих мембраносвязанные субъединицы СДГ. Анализ относительных уровней транскриптов генов *ZmSDH3-1*, *TaSDH3-2*, *ZmSDH4* и *TaSDH4* позволил установить, что засоление по-разному влияет на их экспрессию.

Солевое воздействие NaCl вызывает резкое повышение относительного уровня транскриптов гена *ZmSDH3-1* в первые шесть часов эксперимента. В последующие часы было зарегистрировано значительное снижение его экспрессии, достигнув стабильных значений по отношению к контрольным образцам (Рис. 5а).

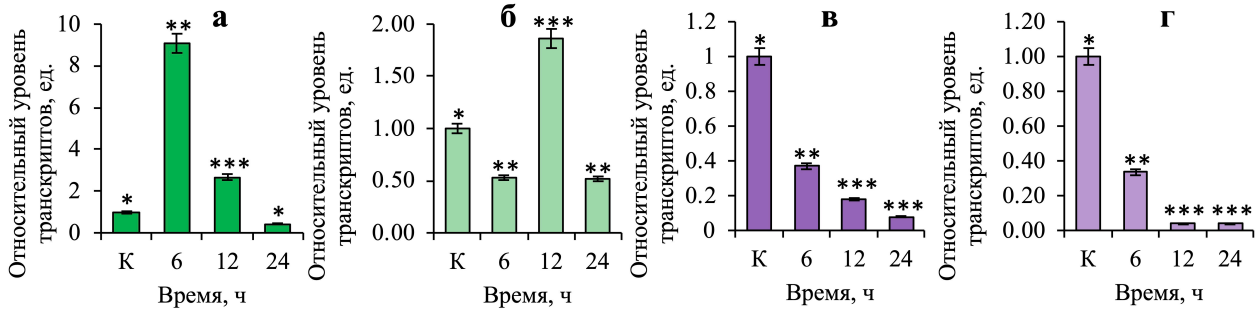

Рис. 5. Уровень транскриптов генов (а) *ZmSDH3-1*, (б) *TaSDH3-2*, (в) *ZmSDH4*, и (г) *TaSDH4* в листьях кукурузы и пшеницы при действии NaCl. К – контроль.

По сравнению с аналогичным геном у *Triticum aestivum* (*TaSDH3-2*), анализ динамики его транскриптома позволил определить, что активация анализируемого гена происходит медленнее и с меньшей интенсивностью, чем у кукурузы.

Максимальные значения уровней транскрипции наблюдались через 12 часов воздействия хлорида натрия, тогда как через 6 и 24 часа экспрессия *TaSDH3-2* падает (Рис. 5б).

Изучение относительного уровня транскриптов гена *SDH4*, кодирующего субъединицу СДГ4, в листьях кукурузы и пшеницы при солевом стрессе, показало устойчивую тенденцию к снижению экспрессии. Отмечалось значительное подавление интенсивности транскрипции данного гена у обоих растительных видов. К 6 часу экспозиции в NaCl уровень транскриптов *SDH4* снизился в 0,63 и 0,66 раза в листьях кукурузы и пшеницы, соответственно. После 12 часов концентрация транскриптов снизилась на 82% в образцах кукурузы, а в листьях пшеницы наблюдалось более 90% угнетение. По завершении суток инкубации в NaCl, уровни мРНК в листьях обоих видов практически не наблюдали, подтверждая сильное ингибирование экспрессии гена (Рис. 5в и 5г). Эти результаты указывают на значительное воздействие солевого стресса на транскрипцию *SDH4* в листьях кукурузы и пшеницы.

По данным транскриптомного анализа удалось выявить, что гены, кодирующие каталитический димер СДГ, положительно регулируются при абиотическом стрессе. Однако гены, ответственные за мембраносвязанные субъединицы, имеют дифференцированную регуляцию в зависимости от времени воздействия. Например, уровень транскриптов *SDH3* повышается, в то время как уровень *SDH4* снижается в листьях обоих видов растений в ответ на действие NaCl. Эти изменения, выявленные на уровне транскрипции изученных генов СДГ, свидетельствуют о том, что солевой стресс влияет на генетическую экспрессию растений и зависит от продолжительности опыта (Hurkman, 1992).

Можно заключить, что гены, кодирующие гидрофильные субъединицы СДГ1 и СДГ2, имеют тенденцию к повышению активности. Это увеличение синтеза белков, вероятно, является частью адаптивной реакции растений, обеспечивающей более высокую скорость окисления сукцината для поддержания митохондриального дыхания и синтеза АТФ на необходимом уровне (Fedorin *et al*., 2022, Omidbakhshfard *et al*., 2012).

Механизмы регуляции экспрессии генов СДГ. Проведенный биоинформатический анализ промоторной области генов, кодирующих субъединицы СДГ в *Zea mays* и *Triticum aestivum*, позволил идентифицировать различные сайты связывания транскрипционых факторов, участвующих в регуляции изучаемых генов.

По полученным результатам были обнаружены *cis*-регуляторные элементы, соответствующие ТФ – bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2/ARF и ERF, которые, как известно, участвуют в генетической регуляции при биотическом или абиотическом

стрессе (Hussain *et al*., 2021). На рисунке 6а и 6б представлено распределение общего количество сайтов связывания ТФ, обнаруженных в промоторной области генов СДГ.

В промоторе *ZmSDH1-2* обнаружено всего 105 сайтов связывания, среди которых на bZIP, C2H2, WRKY, MYB и NAC приходится 46,7% от общего количества. Интересно отметить, что в анализируемом промоторе гена *ZmSDH2-3* выявлено наименьшее количество регуляторных элементов транскрипции - всего 26 сайтов, представленных в 23,1% элементами C2H2, ERF, MYB, NAC и AP2. В гене *ZmSDH3-1* было обнаружено 57 сайтов связывания, 31,6% из которых соответствуют группам ARF, C2H2, MYB, WRKY и NAC, причем WRKY является одним из ТФ с наибольшим количеством сайтов. Заслуживает внимания, что промоторная область гена *ZmSDH4* содержит значительное количество сайтов связывания по сравнению с другими генами. Из 137 обнаруженных сайтов связывания, 91 соответствуют семействам транскрипционных факторов ARF, bZIP, C2H2, ERF, MYB, WRKY и NAC, причем семейство ERF представлено наибольшим числом сайтов.

Результаты анализа генов СДГ-пшеницы (Рис. 6б) показали, что общее количество сайтов связывания в промоторной области гена *TaSDH1* составило 252, из которых 80,9% представлены ТФ, такими как bZIP, C2H2, WRKY, MYB, AP2 и ERF. В промоторе *TaSDH2*, были идентифицированы 122 сайта связывания, среди которых 33,6% принадлежат к семействам bZIP, C2H2, WRKY, MYB, AP2 и NAC. ТФ типа bZIP, C2H2, ERF, MYB, AP2 и NAC составляют 57,5% от их общего количества 160 сайтов связывания в промоторной области гена *TaSDH3-2*. В регуляторной области гена *TaSDH4* данные ТФ составляют 29,3% от общего числа идентифицированных сайтов связывания.

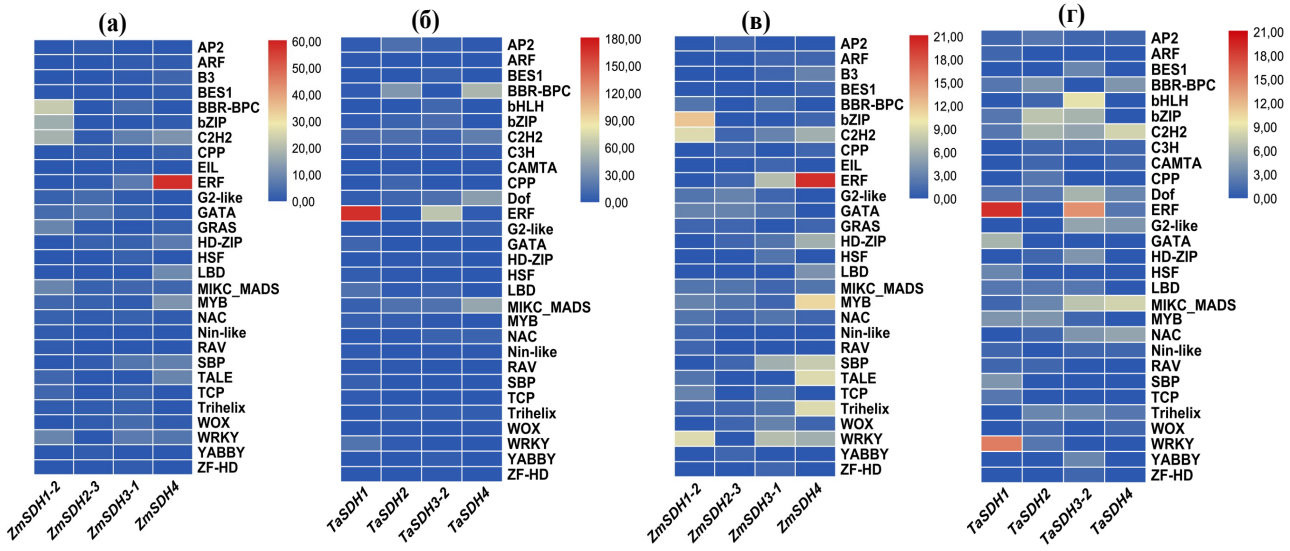

Рис. 6. Общее количество сайтов транскрипционных факторов в промоторах генов СДГ в *Zea mays* (а) и *Triticum aestivum* (б) и количество специфических факторов, участвующих в регуляции генов СДГ в *Zea mays* (в) и *Triticum aestivum* (г). (Флорес Каро, 2023)

Поскольку один и тот же сайт связывания может быть общим для различных факторов транскрипции, было оценено количество специфических ТФ из семейств bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2 и ERF, которые могут регулировать экспрессию генов СДГ при засолении. Для гена *ZmSDH1-2* было обнаружено присутствие 35 ТФ из семейств bZIP, C2H2, WRKY, MYB и NAC. В промоторной области гена *ZmSDH2-3* выявлено наличие 6 различных ТФ из семейств C2H2, ERF, MYB, NAC и AP2. Для *ZmSDH3-1* были определены 21 ТФ, включающих ARF, C2H2, MYB, WRKY и NAC, в то время как в промоторной области *ZmSDH4* было обнаружено наибольшее количество ТФ, в общей сложности 46, включающих ARF, bZIP, C2H2, ERF MYB, WRKY и NAC (Рис. 6в).

В промоторной области гена *TaSDH1* ТФ AP2, ARF, bZIP, C2H2, WRKY, MYB и ERF составляют 64,7% от общего числа выявленных. В *TaSDH2* наиболее представлены ТФ семейств AP2, bZIP, C2H2, WRKY, MYB и NAC, составляя 50%. В генах, кодирующих мембраносвязанные субъединицы СДГ, наблюдалось отсутствие сайта WRKY, но характерно более высокое присутствие NAC. В *TaSDH3-2* 40,8% соответствуют ТФ AP2, BZIP, C2H2, ERF, MYB и NAC, а в *TaSDH4* 39% составляют только ТФ AP2, C2H2, ERF и NAC (Рис. 6г).

Сравнительный анализ промоторных областей генов, кодирующих СДГ у кукурузы и пшеницы, показал наличие сайтов связывания транскрипционных факторов типа WRKY и NAC в большинстве изученных генов. Данные солезависимые факторы транскрипции имеют дифференциальный характер в регуляции генов-мишеней. Увеличение относительных уровней транскрипции генов, кодирующих флавопротеин СДГ1*,* *SDH1-2* и *SDH1* у кукурузы и пшеницы соответственно*,* может быть связано с большей частотой сайтов C/TTGACT/C, которые они имеют в своей регуляторной области. Таким образом, WRKY-белки имеют тенденцию к увеличению транскрипционной активности этих генов. Наблюдаемая разница в повышении экспрессии между генами *ZmSDH1-2* и *TaSDH1* может быть напрямую связана с большим присутствием сайтов w-бокса в регуляторной области *TaSDH1* по сравнению с *ZmSDH1-2*. С другой стороны, гены, которые кодируют субъединицы СДГ3 и СДГ4 как в растениях кукурузы, так и в пшенице, содержат большее присутствие регуляторных сайтов типа NAC в своих промоторных областях по сравнению с каталитическими субъединицами. Это может объяснить низкую интенсивность уровней транскрипции этих генов в условиях солевого стресса.

Анализ промоторов генов СДГ на наличие CpG-островков. Исследование нуклеотидных последовательностей промоторов генов, кодирующих СДГ, позволило установить наличие или отсутствие в них потенциальных CpG-островков. Для идентификации CpG-островков использовались критерии, включающие участки ДНК

длиной не менее 100 п.н., содержащие более 50% гуанина/цитозина и соотношение наблюдаемого и ожидаемого присутствия CpG-динуклеотидов более 0,6 (Li, Dahiya, 2022).

Показано, что в регуляторной области гена *ZmSDH1-2* отсутствуют CpG-островки (Рис. 7а), в то время как в промоторе гена *ZmSDH2-3* был обнаружен один островок размером 149 п.н. (Рис. 7б). В гене *ZmSDH3-1* выявлен один CpG-островок, начинающийся в районе -449 от стартового кодона и имеющий размер 264 п.н. (Рис. 7в). В промоторе гена *ZmSDH4* обнаружен CpG-островок размером 133 п.н., с высокой плотностью динуклеотидов CG, расположенный близко к стартовому кодону (Рис. 7г).

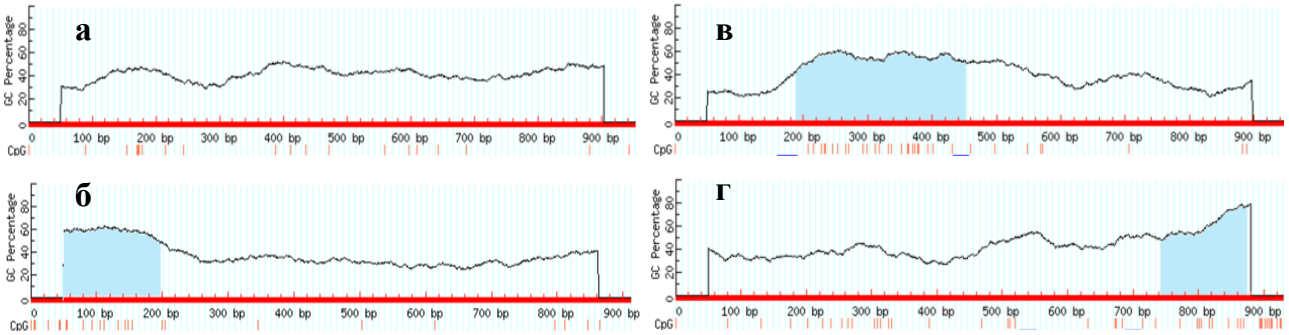

Рис. 7. Анализ промоторной области генов СДГ кукурузы; *ZmSDH1-2* (а) и *ZmSDH2-3* (б), *ZmSDH3-1* (в) и *ZmSDH4* (г) на наличие CpG-островков.

Анализ промоторной области изученных генов, кодирующих СДГ пшеницы, позволил установить наличие CpG-островков в регуляторной области. В нуклеотидной последовательности промотора гена *TaSDH1* наблюдался достаточно крупный CpG-островок, занимающий 76,05% анализируемой области. В гене *TaSDH2*, CpG-островки отсутствуют. В гене *TaSDH3-1* имеется островок размером 390 п.н., расположенный на расстоянии 154 п.н. от стартового кодона. В регуляторной области *TaSDH4* наблюдались два CpG-островка размером 119 п.н. и 109 п.н., расположенные на расстоянии 59 п.н. от стартового кодона.

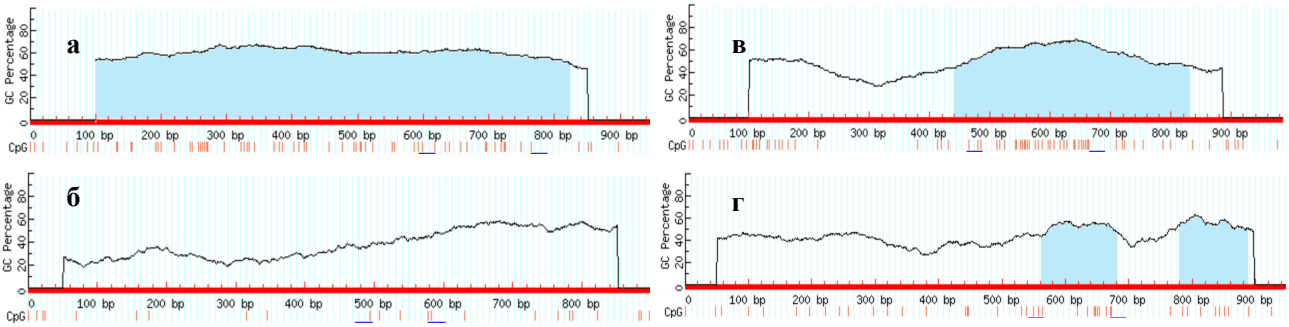

Рис. 8. Анализ промоторной области генов СДГ пшеницы; *TaSDH1* (а) и *TaSDH2* (б), *TaSDH3-1* (в) и *TaSDH4* (г) на наличие CpG-островков.

Эпигенетические механизмы регуляции генов СДГ в листьях кукурузы при воздействии NaCl. С помощью метилспецифичных праймеров, разработанных на основе нуклеотидной последовательности промоторов четырех исследованных генов СДГ, установлено, что для гена *ZmSDH1-2* характерно стабильное метильное состояние CG-динуклеотидов, сохраняющееся на уровне 50% на протяжении всего опыта при солевом стрессе. При этом не наблюдалось корреляции между метильным статусом его промотора и изменением относительного уровня транскрипции.

Промотор гена *ZmSDH2-3* в начале эксперимента метилирован на 75%. Однако за первые шесть часов воздействия NaCl метильный статус CG-динуклеотидов снизился до 50%. В следующие часы данный показатель остается неизменным. Важно отметить, что это изменение уровня метилирования промотора сопровождалось увеличением экспрессии *ZmSDH2-3*.

Аналогичная картина наблюдалась в промоторной области *ZmSDH3-1*, где уровень метилирования исследуемых CG-динуклеотидов составлял 75% в контрольных растениях. В период от 6 до 24 часов инкубации проростков кукурузы в NaCl установлено, что метильный статус промотора *ZmSDH3-1* составляет 50%. В первые шесть часов эксперимента было заметно, что снижение степени метилирования этих нуклеотидов приводило к резкому увеличению экспрессии гена.

С другой стороны, в гене *ZmSDH4* установлено увеличение метилирования его промотора от 50% в листьях растений, инкубированных в стандартных условиях, до 75% в образцах, подвергшихся солевому стрессу. Сравнительный анализ этих уровней метилирования и экспрессии гена позволил заключить, что зависимость между ними обратно-пропорциональная.

Таким образом, результаты указывают на роль эпигенетической регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы СДГ. Наблюдаемые изменения варьировались в зависимости от изучаемых генов. В условиях солевого стресса метилирование промоторной области, по-видимому, не влияло на динамику экспрессии гена *SDH1-2*. В случае *SDH2-3* наблюдалось, что этот эпигенетический механизм вызывал повышение активности этого гена в первые 6 часов эксперимента. Аналогичная тенденция была обнаружена в *SDH3-1* за тот же период времени. Однако, в последующие часы воздействия хлорида натрия удалось установить пассивную роль эпигенетической регуляции, поскольку изменения в экспрессии генов, кодирующих субъединицы 2 и 3 СДГ, у растений, подвергшихся засолению, не связаны с флуктуацией метилирования изученных CG-динуклеотидов в их промоторных областях. С другой стороны, *SDH4* оказывает сильную отрицательную регуляцию активности гена, сопровождающуюся снижением метильного статуса его промотора, также в течение первых 6 часов инкубации в NaCl.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение высокоочищенных ферментных препаратов СДГ из листьев *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L.*, инкубированных как в стандартных условиях, так и при действии кратковременного солевого стресса, позволило изучить их кинетические свойства, которые показали определенные различия. Наблюдаемые изменения в кинетике изоферментов, вероятно, свидетельствуют о большей стабильности их структур и увеличении их каталитических способностей и, таким образом, эффективно регулируют различные метаболические процессы в клетке в ответ на стрессовые факторы.

Показано, что активность СДГ кукурузы значительно возрастает при концентрации NaCl 150 мМ, тогда как в митохондриях пшеницы общая активность СДГ практически не менялась вплоть до концентрации 100 мМ NaCl. Вероятно, это связано с различиями в составе аминокислотных последовательностей СДГ у разных видов растений, что обусловливает дифференциальную чувствительность к повышенному содержанию ионов натрия и хлорида в среде (Kearney *et al*., 1974).

В растениях с метаболизмом С3 и С4-типа, солевой стресс индуцирует увеличение интенсивности функционирования цикла Кребса и окислительного фосфорилирования. Активность СДГ *in vivo* повышалась при засолении, вероятно, во-первых, за счет ионизации каталитического центра фермента, вызванной Cl^-; во-вторых, путем активации обходного пути ГАМК, который обеспечивает больший синтез сукцината. Кроме того, установленное возрастание скорости работы сукцинат–оксидазной системы свидетельствует об увеличении потока электронов через ЭТЦ вследствие изменения электрохимического градиента в результате непосредственной стимуляции хлоридом натрия активности АТФ–синтазы (Smith *et al*., 2009).

Полярографический метод позволил установить, что альтернативный оксидазный путь активируется в митохондриях, выделенных из листьев кукурузы и пшеницы. Повышение активности АОП, играющей важную роль в регуляции окислительного стресса, вызванного ростом синтеза активных форм кислорода, указывает на то, что часть адаптивного ответа растений на увеличение ионов Na^+ и Cl^- определяется участием нефосфорилирующей цепи переноса электронов. Большее участие АОП обнаружилось в листьях кукурузы, чем в листьях пшеницы, что свидетельствовало о том, что *Zea mays L.* более чувствительна к солевому стрессу по сравнению с *Triticum aestivum L*.

Были выявлены изменения относительного уровня транскрипции генов СДГ при влиянии солевого стресса на изучаемые в работе растения и показано увеличение мРНК генов флавиновой и железо-серной субъединиц сукцинатдегидрогеназы. Следовательно, результаты проведенного исследования позволяют предположить, что

ее функционирование регулируется интенсивностью уровней транскрипции генов. Установлена быстрая активация гена *ZmSDH3-1* после шести часов инкубации в хлориде натрия, тогда как ген *TaSDH3-2* проявлял максимальную активность к 12 часам. С другой стороны, сильное ингибирование уровня экспрессии проявляется на генах *ZmSDH4* и *TaSDH4*.

Установлено, что зависимость интенсивности активности генов СДГ кукурузы от статуса метилирования CG-динуклеотидов в их промоторах была вариабельной. В листьях кукурузы в условиях солевого стресса метилирование промоторной области не влияло на динамику экспрессии гена *ZmSDH1-2*. В случае генов *ZmSDH2-3* и *ZmSDH3-1* этот эпигенетический механизм вызывал повышение активности этих генов в первые 6 часов эксперимента. Однако в последующие часы воздействия хлорида натрия, изучаемый механизм вероятно играет пассивную роль, поскольку изменения в экспрессии этих генов не коррелировали с колебаниями метилирования исследуемых CG-динуклеотидов. С другой стороны, *ZmSDH4* оказывал сильную отрицательную регуляцию генной активности, сопровождавшуюся снижением метильного статуса его промотора также в течение первых 6 часов инкубации в NaCl.

Анадиз нуклеотидных последовательностей регуляторной области генов сукцинатдегидрогеназы в *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L.*, позволил идентифицировать сайты связывания разных семейств транскрипционных факторов bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2/ARF и ERF, участвующих в регуляции генов в условиях абиотического стресса. Особое внимание обращает наличие сайтов связывания транскрипционных факторов WRKY и NAC в регуляторных областях генов, кодирующих СДГ, как у кукурузы, так и у пшеницы. Вероятно, транскрипционный фактор WRKY принимает непосредственное участие в регуляции активности гена *SDH1* у *Zea mays* и *Triticum aestivum* благодаря наличию 9 сайтов C/TTGACT/C в регуляторной области *SDH1* у кукурузы и 15 в промоторе *SDH1* у пшеницы. Этим можно объяснить разницу в интенсивности экспрессии этих генов у двух типов растений. Наличие сайтов NAC преобладает в генах, кодирующих мембраносвязанные субъединицы СДГ как у кукурузы, так и у пшеницы. Однако в отличие от *SDH3* и *SDH4* у пшеницы, где наблюдалась более высокая частота регуляторных сайтов NAC, у кукурузы в этих же генах присутствуют WRKY и NAC. Наличие сайтов NAC может объяснить тенденцию к ингибированию экспрессии генов, кодирующих эти субъединицы, у обоих видов растений в условиях солевого стресса.

Таким образом, результаты данной работы показали, что СДГ играет важную роль в регуляции клеточного метаболизма и митохондриального дыхания в листьях пшеницы и кукурузы в условиях стресса. Показан экспрессионный механизм

контроля скорости функционирования СДГ, однако, для некоторых генов решающим является эпигенетический механизм, обусловленный вариацией метильного статуса CpG-островков в промоторах исследуемых генов.

Полученные результаты согласуются с информацией предыдущих исследований о важности метилирования промоторов в регуляции генов, кодирующих ферменты ЦТК в период прорастания растений (Епринцев *et al*., 2022), изменения светового режима (Епринцев *et al*., 2019), гипоксии (Епринцев *et al*., 2021) и засоления (Епринцев, Гатауллина, 2023). Ранее было показано, что изменение уровня метилирования промотора генов, кодирующих субъединицы СДГ, представляет собой механизм их регуляции в условиях гипоксии (Eprintsev *et al*., 2017) и при прорастании (Епринцев *et al*., 2016). Если в условиях гипоксии это приводит к ингибированию СДГ и накоплению сукцината, то солевой стресс, напротив, вызывает активацию СДГ, обусловленную усилением экспрессии каталитического димера. Эти исследования показали, что метилирование промотора является важным механизмом регуляции активности СДГ в условиях абиотических стрессов.

На основе полученных данных была разработана гипотетическая схема регуляции функционирования СДГ в листьях кукурузы при солевом стрессе (Рис. 9).

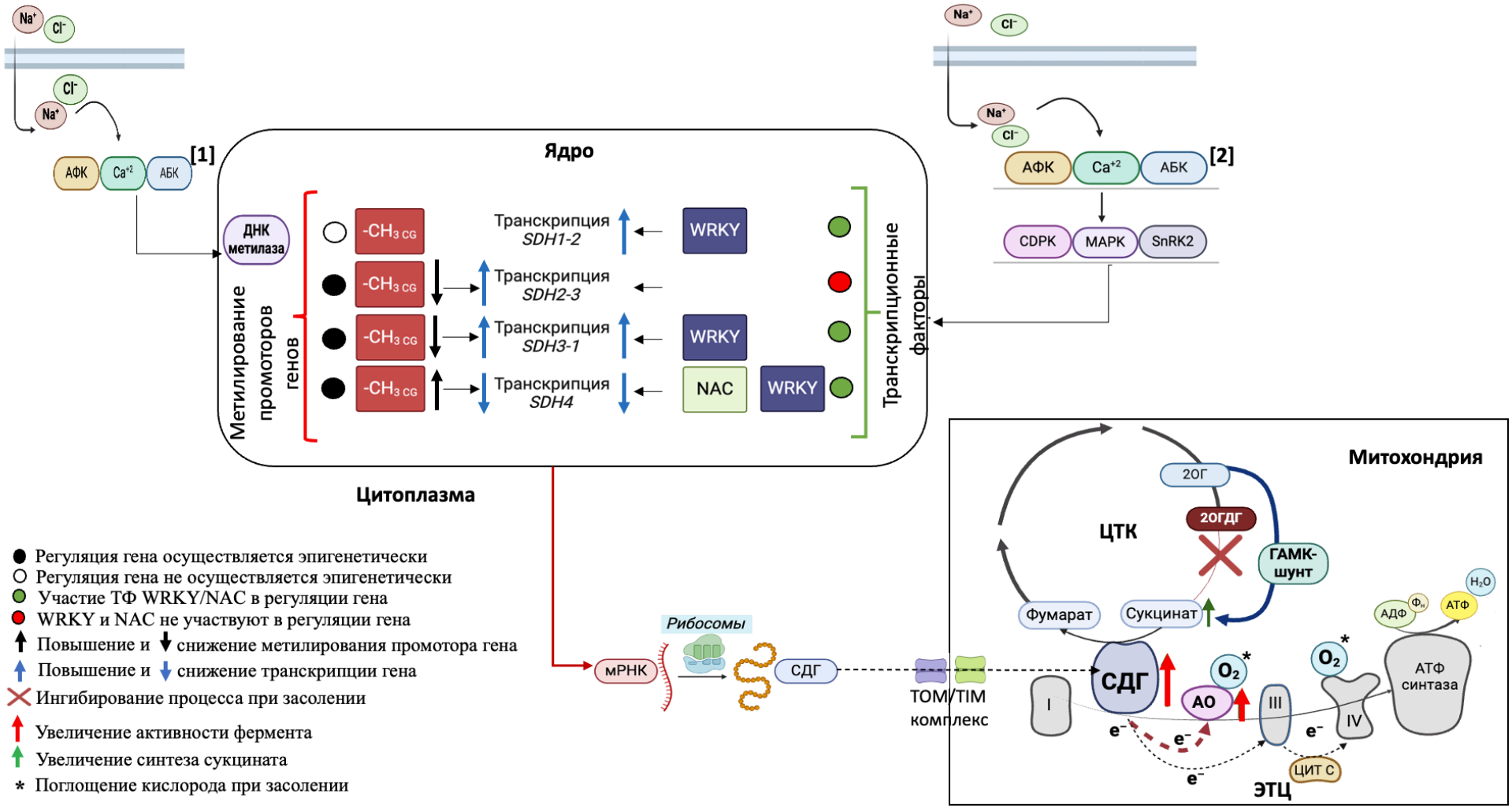

Рис. 9. Гипотетическая схема функционирования сукцинатдегидрогеназы в митохондриях листьев кукурузы и регуляция его активности в условиях кратковременного солевого стресса. Условные обозначения: СДГ – сукцинатдегидрогеназа, мРНК – суммарная матричная РНК, АБК – абсцизовая кислота, ТФ – транскрипционный фактор, АО – альтернативная оксидаза, 2ОГДГ – 2 оксоглутаратдегидрогеназа. [1] (Vendramin et al., 2020, Huang et al., 2019, Li et al., 2023) [2] (Finkler et al., 2007, Chaudhry et al., 2022)

ВЫВОДЫ

1. Получены высокоочищенные гомогенные препараты изоферментов СДГ из листьев *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L*. и исследовано влияние солевого стресса на их некоторые кинетические и регуляторные свойства. Изоферменты СДГ из растений, инкубированных в стандартных условиях и при солевом стрессе, имели определенные различия в их кинетических свойствах, таких как изменение сродства к субстрату и значений оптимальных величин pH. Данные отличия в их свойствах указывают на влияние СДГ в регуляции адаптивного ответа метаболизма растений на стрессовые факторы.
2. Выявлено, что каталитическая активность СДГ *in vivo* в листьях проростков кукурузы и пшеницы стимулируется в условиях кратковременного солевого стресса. При этом, сукцинатоксидазная система и альтернативный оксидазный путь характеризуются более высокой активностью, что связано с усилением митохондриального дыхания, зависящего от наличия в достаточном количестве сукцината. Его концентрация поддерживается на необходимом уровне с помощью ГАМК-шунта. Анализ участия АОП выше в листьях кукурузы, что свидетельствует о том, что это растение более чувствительно к солевому стрессу по сравнению с пшеницей.
3. Были выявлены изменения относительного уровня транскрипции генов СДГ при влиянии солевого стресса на листья растений. Показано, что засоление увеличивает уровень транскрипции генов, кодирующих каталитический димер СДГ в листьях кукурузы и пшеницы. Активация СДГ необходима для метаболизма сукцината, образующегося из ГАМК-шунта, и его окисление сукцинатоксидазной системой.
4. Биоинформатический анализ регуляторной области генов СДГ кукурузы и пшеницы позволил установить наличие сайтов солезависимых транскрипционных факторов WRKY и NAC. Высокая частота сайтов W-бокса наблюдалось в генах СДГ кукурузы *ZmSDH1-2*, *ZmSDH3-1* и в гене СДГ пшеницы *TaSDH1*. В пшенице, в генах *TaSDH3-2* и *TaSDH4* отсутствуют сайты WRKY и преобладают сайты NAC, что может объяснить низкую интенсивность их экспрессии, что связано с ингибирующей активностью данного типа транскрипционных факторов.
5. Установлена зависимость экспрессии генов СДГ от статуса метилирования CG-динуклеотидов в их промоторах. При кратковременном солевом стрессе выявлено регулирующее действие эпигенетических механизмов на функционирование генов, кодирующих субъединицы СДГ2, СДГ3 и СДГ4. Постоянство метильного статуса гена *ZmSDH1-2* при засолении обусловлено отсутствием CpG островка в его промоторе как потенциального маркера цитозин-ДНК-метилтрансферазы. Обнаруженное сходство биохимических и молекулярных механизмов регуляций экспрессии генов СДГ у кукурузы и пшеницы позволяет предположить наличие идентичных эпигенетических механизмов контроля экспрессионной активности данных генов в пшенице.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Fedorin D.N., Eprintsev A.T., Florez Caro O.J., Igamberdiev A.U. Effect of Salt Stress on the Activity, Expression, and Promoter Methylation of Succinate Dehydrogenase and Succinic Semialdehyde Dehydrogenase in Maize (*Zea mays* L.) Leaves // Plants. – 2023. T.12. – С. 68. **Web of Science**
2. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Флорес Каро О.Х. Очистка и некоторые кинетические характеристики изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы при солевом стрессе //Прикладная биохимия и микробиология. –2022. –Т. 58. –№. 6. –С. 629-634. **ВАК**
3. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Флорес Каро О.Х. Эпигенетический механизм регуляции экспрессии генов мембраносвязанной субъединицы с сукцинатдегидрогеназы в прорастающих семенах кукурузы //Физиология растений. – 2022. – Т. 69. – №. 2. –С. 142-148. **ВАК**
4. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Карабутова Л.А., Флорес О., Пуглла М. Получение и свойства изоферментов сукцинатдегидрогеназы из щитков кукурузы (Zea mays L) //Прикладная биохимия и микробиология. –2018. –Т. 54. –№. 1. –С. 42-45. **ВАК**
5. Карабутова, Л.А., Федорин, Д.Н., Флорес, О.Х., Епринцев, А.Т. Выделение изоферментов сукцинатдегидрогеназы из щитков семян кукурузы методом ионообменной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы, –2018. –Т. 17. –№. 5. –С. 818-823. **ВАК**
6. Флорес Каро О. Х. Изменение ферментативной активности сукцинатдегидрогеназы в листьях проростков кукурузы под воздействием долговременного солевого стресса / О.Х. Флорес Каро // Организация и регуляция физиологобиохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. — Воронеж, 2024.— Вып. 26. - С. 180-183.
7. Флорес Каро О. Х. Влияние долговременного солевого стресса на ферментативную активность сукцинатдегидрогеназы в проростках пшеницы *Triticum aestivum* / О.Х. Флорес Каро, А.А. Петрова // Организация и регуляция физиологобиохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. — Воронеж, 2024.— Вып. 26. - С. 180-183.
8. Флорес Каро О. Х. Идентификация сайтов связывания факторов транскрипции в промоторной области генов сукцинатдегидрогеназы у растений / О.Х. Флорес Каро // Организация и регуляция физиологобиохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. — Воронеж, 2023.— Вып. 25. - С. 180-184.
9. Флорес Каро О. Х. Присутствие сайтов связывания w-box транскрипционных факторов WRKY в генах, кодирующих субъединицы сукцинатдегидрогеназы / О.Х. Флорес Каро, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев, А.А. Петрова, Е.В. Плотникова // Организация и регуляция физиологобиохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. — Воронеж, 2022.— Вып. 24. - С. 264-269.
10. Флорес Каро О.Х. Кратковременный солевой стресс вызывает изменения ферментативной активности сукцинатдегидрогеназы в листьях проростков *Zea mays L.*/ О.Х. Флорес Каро, А.А. Петрова // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. — Воронеж, 2021.— Вып. 23. - С. 254-257.
11. Флорес Каро О.Х. Метилирование промотора гена *sdh3-1* субъединицы с сукцинатдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы / О.Х. Флорес Каро, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. — Воронеж, 2020.— Вып. 22. - С. 196-201.
12. Flórez Caro O.J. Effect of salt stress on succinate dehydrogenase: enzyme activity, gene expression, and promoter analysis in leaves of *Triticum aestivum* and *Zea mays* / O.J. Florez, D.N. Fedorin, A.T. Eprintsev // VII International Scientific Conference "Genetics, Genomics, Bioinformatics and Plant Biotechnology" (PLANTGEN 2023) (Kazan, 10-15 July 2023) — Kazan, 2023.— С. 134.
13. Флорес Каро О.Х. Регуляция функционирования сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях солевого стресса / О.Х. Флорес, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев // Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий». Годичное собрание Общества физиологов растений России. (Нижний Новгород, 27-30 сентября 2022 г.) — Нижний Новгород, 2022.— С. 131.
14. Флорес О.Х. Экспрессия и метилирование промоторов генов *SDH3-1* и *SDH3-2* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы: электронный ресурс // Ломоносов -2021: материалы международного молодежного научного форума: Секция "Молекулярная Биология". — Москва, 2021. — С. 1-2.