

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
“ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ”
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)

Флорес Каро
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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор Епринцев А.Т.

Воронеж 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Общие сведения о сукцинатдегидрогеназе.	14
1.1.1 Особенности структуры сукцинатдегидрогеназы	16
1.1.2 Биохимические аспекты регуляции функционирования сукцинатдегидрогеназы.	20
1.2 Молекулярно-эпигенетические аспекты функционирования СДГ	24
1.2.1 Эпигенетическая регуляция у высших растений	27
1.2.1.1 Метилирование ДНК	29
1.2.1.2 Роль метилирования ДНК в регуляции экспрессии генов	30
1.2.1.3 Эпигенетические модификации метаболизма растений в условиях абиотического стресса.	32
1.2.1.4 Метилирование промоторов и регуляция экспрессии генов, кодирующих СДГ	34
1.3 Абиотический стресс и влияние солевого стресса на метаболизм растений	37
1.3.1 Осмотический стресс	38
1.3.2 Ионный стресс	39
1.3.3 Окислительный стресс	41
1.3.4 Влияние засоления на функциональность цикла трикарбоновых кислот.	42
1.3.5 Электрон-транспортная цепь митохондрий и солевой стресс	48

1.4 Роль транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов в условиях засоления	50
Глава II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	55
2.1 Цель и задачи исследования	55
2.2 Объекты и методы исследования	56
2.2.1 Объекты исследования	56
2.2.2 Экспериментальная постановка по моделированию солевого стресса ..	56
2.2.3 Определение активности сукцинатдегидрогеназы	56
2.2.4 Выделение митохондрий из растительного материала	57
2.2.5 Определение активности сукцинатоксидазной системы	57
2.2.6 Определение количества белка	58
2.2.7 Выделение и очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы	58
2.2.8 Электрофоретическое исследование сукцинатдегидрогеназы	59
2.2.8.1 Электрофоретический анализ	59
2.2.8.2 Специфическое проявление изоферментов	59
2.2.8.3 Определение гомогенности ферментных препаратов	59
2.2.9 Исследование кинетических особенностей регуляции изоферментов ..	59
2.2.10 Экстракция суммарной клеточной РНК и ДНК	60
2.2.10.1 Выделение суммарной РНК	60
2.2.10.2 Выделение ДНК	60
2.2.10.3 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	60
2.2.11 Реакция обратной транскрипции	61
2.2.12 Проведение ПЦР в реальном времени	61
2.2.13 Бисульфитная модификация ДНК.	63

2.2.14 Анализ промоторов генов и подбор праймеров для метил-специфичной ПЦР	63
2.2.15 Проведение метил-специфичной ПЦР	64
2.2.16 Анализ промоторной области генов на наличие сайтов связывания солевых факторов транскрипции.	64
2.2.17 Статистическая обработка данных	65
Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1 Влияние солевого стресса на функционирование сукцинатдегидрогеназы	66
3.1.1 Влияние NaCl на активность фермента сукцинатдегидрогеназы в изолированных митохондриях.	66
3.1.2 Очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы и изучение их кинетических характеристик	68
3.1.2.1 Определение рН-оптимума изоферментов сукцинатдегидрогеназы. .	73
3.1.2.2 Определение константа Михаэлиса-Ментен и V_{max} для полученных изоферментов СДГ	75
3.1.3 Влияние солевого стресса на митохондриальное дыхание и активность сукцинатоксидазы.	76
3.1.4 Изменение активности сукцинатдегидрогеназы в условиях засоления <i>in vivo</i>	79
3.2 Влияние солевого стресса на регуляцию экспрессии генов СДГ	81
3.2.1 Изменение экспрессионной активности генов, кодирующих каталитический димер СДГ в <i>Zea mays</i> и <i>Triticum aestivum</i>	81
3.2.2 Влияние солевого стресса на изменение транскриптов генов мембраносвязанных субъединицы СДГ в листьях кукурузы и пшеницы	87

3.3	Механизмы регуляции генетической активности генов сукцинатдегидрогеназы при действии засоления.	91
3.3.1	Распределение специфичных сайтов взаимодействия факторов транскрипции в нуклеотидной последовательности промоторов генов сукцинатдегидрогеназы <i>Zea mays L</i> и <i>Triticum aestivum L</i>	91
3.3.2	Анализ промоторов генов сукцинатдегидрогеназы на наличие CG-островков	95
3.3.3	Эпигенетические механизмы регуляции генов СДГ в листьях кукурузы, при воздействии хлорида натрия.	98
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
	ВЫВОДЫ	105
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2ОГДГ – 2 оксоглутаратдегидрогеназа;

АБК – абсцизовая кислота;

АМФ – аденозинмонофосфат;

АО – альтернативная оксидаза;

АОП – альтернативный оксидазный путь;

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота;

АФК – Активные формы кислорода;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

БФС – бромфеноловый синий;

ГАМК – γ Аминомасляная кислота;

ДДС – додецилсульфат натрия

ДТТ–дитиотреитол;

ДЭАЭ – диэтиламиноэтил

ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол;

мРНК – матричная РНК;

МС-ПЦР – метилспецифичная полимеразная цепная реакция

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота

СДГ – сукцинатдегидрогеназа;

СОС – сукцинат-оксидазная система;

ТРИС – трис(гидроксиметил)аминометан;

ТФ – транскрипционный фактор;

ФАД — флавинадениндинуклеотид;

ФМС – феназинметасульфат;

ЦРУ – цианидрезистентное участие;

ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид;

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот;

ЭГТА – этиленгуанинтетраацетат;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЭТЦ – электронтранспортная цепь;

Rf – общая электрофоретическая подвижность белка;

ТІМ – Транслоказа внутренней мембраны митохондрий;

ТОМ – Транслоказа внешней мембраны митохондрий;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Засоленность является важным фактором экологического стресса, который в основном влияет на сельскохозяйственные культуры во всем мире, а хлорид натрия является наиболее распространенной солью, вызывающей солевой стресс в растениях [169]. Адаптивная реакция растений состоит из ряда метаболических механизмов поддержания толерантности, которые способствуют предотвращению отрицательного влияния засоления на клеточные функции [103].

Понимание молекулярной основы устойчивости растений к засолению также поможет улучшить устойчивость к засухе и экстремальным температурам, поскольку осмотический стресс является общим для этих абиотических стрессов [54].

Одной из органических молекул, имеющих фундаментальное значение в модуляции адаптивного ответа растений на внешние стрессовые факторы, является сукцинат [158, 41]. 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 [161]. В высших растениях, сукцинат накапливается в клетках в условиях стресса вследствие усиления «солевого дыхания» [156], обуславливающего окислительно-восстановительный баланс в митохондриях и синтезом активных форм кислорода [162]. 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 [13, 51].

Особый интерес представляет понимание изменений состава и кинетических свойств изоферментов СДГ, а также механизмов регуляции их ферментативной активности на биохимическом, генетическом и эпигенетическом уровне [139]. 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 сукцинатдегидрогеназы 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 кратковременном 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-оксидажной 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.

Исследование 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 сукцинатдегидрогеназы 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.

Выявлены 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 активизирует 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 индексируются в Web of Science и Scopus.

Структура и объём работы.

Диссертационная работа 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 рисунка и 7 таблиц.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о сукцинатдегидрогеназе

В эукариотических клетках существуют два метаболических процесса, играющих фундаментальную роль в клеточном дыхании и образовании энергии. Эти два взаимосвязанных процесса известны как цикл Кребса и окислительное фосфорилирование. Цикл Кребса, также известный как цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), основным образом служит для окисления углеводов, что приводит к образованию энергии в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) [38]. В этом цикле образуются промежуточные углеродные соединения, действующие как предшественники для синтеза аминокислот, липидов и нуклеотидов [115]. Кроме того, в ЦТК синтезируются два важных кофермента в восстановленной форме: никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и флавинадениндинуклеотид (ФАДН₂) необходимы для функционирования электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) при окислительном фосфорилировании [200].

Белковый комплекс сукцинатдегидрогеназы (СДГ КФ 1.3.99.1), также известный как митохондриальный комплекс II или сукцинат:убихиноноксидоредуктаза, является важным ферментом, который связывает окисление сукцината в ЦТК [113] с переносом электронов в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях [97]. СДГ действует как важная точка контроля потока углерода, становясь, таким образом, основным местом метаболической регуляции в ЦТК. Субстратом СДГ является молекула сукцината, выполняющая функцию «сигнальной молекулы». Молекула сукцината участвует в передаче сигналов цикла, т.е. является индикатором состояния процесса окисления углерода в ЦТК. Эта сигнальная функция зависит от его накопления в митохондриях и модуляции активности СДГ [134].

Сукцинатдегидрогеназа катализирует превращение сукцината в фумарат (Рис 1). Каталитическая реакция СДГ начинается с взаимодействия молекулы сукцината с активным центром субъединицы СДГ1, предварительно флавинированной и связанной с СДГ2. В результате, домен закрывается и таким образом сукцинат взаимодействует с изоаллоксазиновым кольцом ФАД, на этом этапе субстрат окисляется в фумарат, а два электрона и два протона от этой реакции передаются коферменту ФАД [157]. Окисление сукцината зависит от ковалентного связывания ФАД с остатком His в активном центре СДГ [86, 157]. В дальнейшем, электроны ФАДН₂ передаются через железосерные кластеры субъединицы СДГ2; [2Fe-2S], [3Fe-4S] и [4Fe-4S]. На последней стадии, в гидрофобных трансмембранных субъединицах СДГ3 и СДГ4, содержащих специфический сайт связывания молекулы убихинона (Q) [111], происходит акцептирование электронов Q и таким образом, образуется реакционноспособный радикал семихинон, который впоследствии восстанавливается до убихинола. [88].

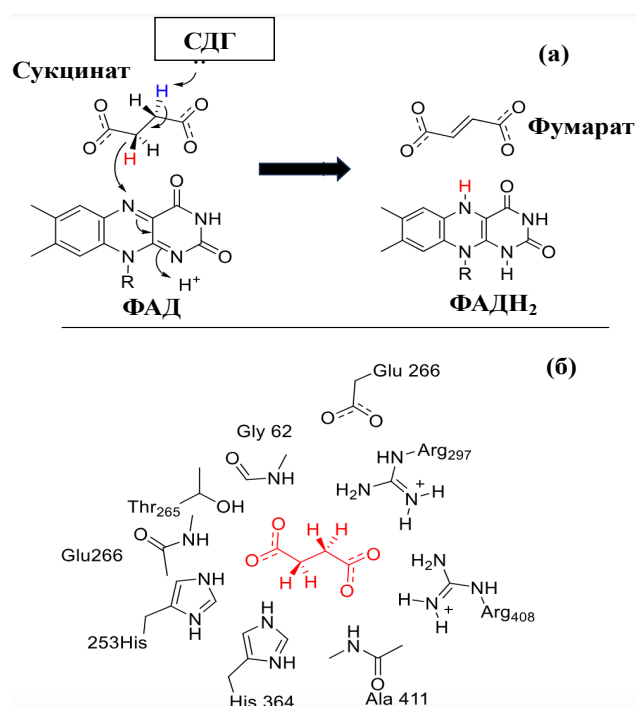


Рис. 1. Реакция окисления сукцината в фумарат [104]. (а) - общий механизм окисления сукцината и его взаимодействие с ФАД. (б) - аминокислоты, окружающие сукцинат в птичьем варианте СДГ (1уq4) [96].

1.1.1 Особенности структуры сукцинатдегидрогеназы

Согласно исследованиям, проведенным по строению фермента сукцинатдегидрогеназы СДГ, у прокариотических и эукариотических организмов наблюдается аналогичный состав. В прокариотических организмах, таких как *Escherichia coli*, структура СДГ была определена методом рентгеновской кристаллографии с разрешением 2,6 Å [192]. На основании результатов, полученных по кристаллическим структурам СДГ *E. coli*, фумаратредуктазы *E. coli* и фумаратредуктазы *Wolinella succinogenes* Ойедотун и Лемир построили модель четвертичной структуры тетрамерной СДГ *Saccharomyces cerevisiae* [147].

СДГ в эукариотических клетках классически состоит из 4 субъединиц, две из которых СДГ1 и СДГ2 являются гидрофильными, ориентированы к митохондриальному матриксу и входят в состав каталитического центра фермента с молекулярными массами 70 и 30 кДа. соответственно. Этот димер имеет размер 70 Å в ширину и 80 Å в высоту [112]. Другие субъединицы, СДГ3 и СДГ4 представляют собой два гидрофобных мембраносвязанных белковых компонента, необходимых для прикрепления ферментного комплекса на митохондриальной мембране. Гидрофобный якорный хвост имеет ширину ~45 Å и высоту ~45 Å [175]. Их молекулярные массы равняются 16,7 кДа для СДГ3 и 16,6 кДа для СДГ4 [152].

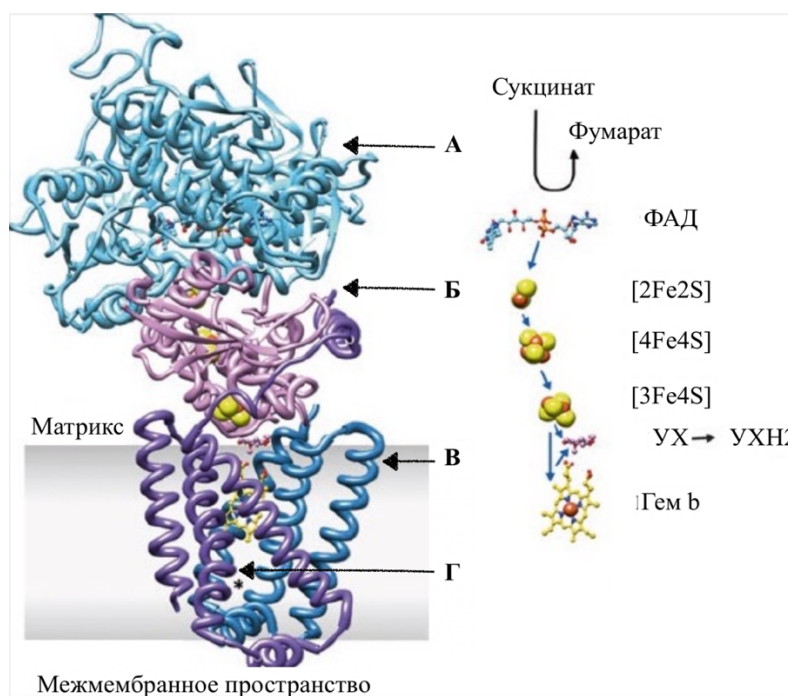


Рис 2. Структура сукцинатдегидрогеназы [175]. А – флавопротеин СДГ1 (Fr), ковалентно связанный с ФАД. Б – СДГ2 (субъединица Ir), содержащая кофакторы [2Fe-2S], [4Fe-4S] и [3Fe-4S]. В и Г: мембраносвязанные субъединицы СДГ3- СДГ4.

Исследования кристаллической структуры и аминокислотной последовательности СДГ позволяют выяснить, что взаимодействие между молекулой ФАД и центром связывания субстрата хорошо консервативно среди полипептидов СДГ1, где ФАД ковалентно связан с His-87. Эта ковалентная связь осуществляется посредством вторичной амидной связи между атомом N3 гистидилимидазола и 8 α -метильной группой изоаллоксазинового кольца (связь N3-гистидил-8 α - ФАД). Сайт связывания субстрата образован изоаллоксазиновым кольцом ФАД и боковыми цепями Arg-329, His-396, Arg-441 и Phe-161, при этом Arg-441 и Ser-446 участвуют в переносе протонов от каталитической реакции превращения сукцината в фумарат [78].

СДГ2 содержит два основных домена: N-концевой домен с основным пятинитевым β -листом и небольшой спиралью, примыкающий к ФАД при связывании с СДГ1, и C-концевой α -спиральный домен с шестью спиральями, связанными петлями. Кофактор [2Fe-2S] является первым кластером в цепи

переноса электронов от ФАД и обнаруживается связанным в N-концевом домене субъединицы 2 [175]. С-концевой домен отвечает за связывание групп [4Fe-4S] и [3Fe-4S] [153]. Группа [4Fe-4S] является центром транспорта электронов через СДГ2 и имеет низкий потенциал средней точки, который действует как энергетический барьер против переноса электронов. [3Fe-4S], в отличие от двух других неорганических кофакторов, координируется тремя аминокислотными остатками [153].

Два электрона, образующиеся при дегидрировании сукцината, транспортируются через три кластера от СДГ2 к убихинону, который стабилизирован цепями His207 у СДГ2, Ser27 и Arg31 у СДГ3 и Tyr83 у СДГ4 [147]. Несмотря на то, что редокс-простетическая группа гем b присутствует в митохондриальном комплексе II, его функция в переносе электронов до сих пор не ясна [111]. В структуре СДГ у E. Coli гем b ближе к группе 3Fe-4S, чем к убихинону, это позволяет предположить, что гем b может выступать регулятором переноса электронов через СДГ. Однако, у эукариотических организмов расстояние между [3Fe-4S] и убихиноном составляет 7,1 Å, это меньше, чем расстояние между той же кластерной группой и гемовой группой b (13,3 Å) с окислительно-восстановительным потенциалом ниже, чем у 3Fe-4S и убихинон, что указывает на невыгодность посреднической функции при переносе электронов через гем b.

В дополнение к этим 4 субъединицам недавние исследования на арабидопсисе и рисе выявили новые субъединицы, связанные с СДГ, с молекулярной массой примерно 18 кДа (СДГ5), 15 кДа (СДГ6), 7 кДа (СДГ7) и 5 кДа (СДГ8); однако, структура и функция каждой из этих субъединиц до конца не выяснены [74]. Важно подчеркнуть, что эти новые субъединицы, идентифицированные в Комплексе II высших растений, поднимают интересные вопросы об их конкретной функции и их вкладе в общую структуру и функцию комплекса. Их сохранение в эмбриофитах предполагает эволюционное значение, в то время как их отсутствие в определенных группах

указывает на функциональное разнообразие [137]. Детальное изучение этих субъединиц, особенно посредством более современного биохимического анализа, обещает углубить знание основных молекулярных процессов и их значимости в контексте биоэнергетики и функций СДГ в митохондриях высших растений.

Изучение биогенеза и сборки сукцинатдегидрогеназы в последнее время представляет большой интерес, учитывая важную роль СДГ как в метаболических процессах, так и в процессах клеточного дыхания. Для сборки и интеграции комплекса СДГ необходим сложный многоступенчатый механизм. На данный момент идентифицировано четыре фактора сборки, которые играют роль в образовании комплекса СДГ. Они известны как SDHAF1, SDHAF2, SDHAF3 и SDHAF4 [97].

SDHAF1 является членом семейства белков LYR и содержит трипептидный мотив LYR (лейцин/тирозин/аргинин), который присутствует в N-концевой области нескольких белковых последовательностей у разных видов организмов, включая растения [124]. SDHAF1 вместе с SDHAF3 опосредуют созревание субъединицы СДГ2 [140]. С другой стороны, SDHAF2 необходим для флавинирования СДГ1 и сборки комплекса [43]. Структура представляет собой пятиспиральный пучок с областью четко выраженных поверхностных остатков. Эта область состоит из отрицательно заряженной периферии и положительно заряженной поверхности, а также гидрофобной области. Область расположена в α -спиралях I, II и соединительной полосе. Изменения в SDHAF2 приводят к потере функции комплекса СДГ, что напрямую влияет на функциональность митохондрий и развитие растений [98]. SDHAF4 специфически взаимодействует с каталитической субъединицей СДГ1 в митохондриальном матриксе после завершения ароматизации молекулы, способствуя ее связыванию с СДГ2 и последующей сборке голокомплекса СДГ. SDHAF4 способствует образованию димер-гидрофильной

СДГ путем стабилизации и поддержания субъединицы СДГ1 в устойчивом состоянии сборки перед взаимодействием со стабильностью СДГ2 [43].

1.1.2 Биохимические аспекты регуляции функционирования сукцинатдегидрогеназы

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) регулируется прямо или косвенно с помощью нескольких биохимических механизмов, которые включают промежуточные соединения ЦТК [113], активирующие лиганды, такие как дикарбоновые кислоты, одновалентные катионы или анионы [109], энергетические макромолекулы, такие как АДФ и АТФ. [35] или наночастицы Fe [154]. Ниже мы рассмотрим эти регуляторные механизмы белкового комплекса СДГ.

Ингибирование активного центра посредством интермедиатов, синтезируемых в процессе ЦТК, является одним из способов модуляции каталитической активности сукцинатдегидрогеназы. Двумя из этих промежуточных продуктов являются оксалоацетат и малонат, которые, как известно, представляют собой мощные ингибиторы СДГ [85, 8]. Оксалоацетат действует как ингибитор передачи сигнала, то есть его накопление указывает клетке на избыток продуктов цикла ЦТК. В результате ферментативная активность СДГ регулируется отрицательно, чтобы предотвращать дальнейшее накопление промежуточных продуктов ЦТК. Оксалоацетат действует как конкурентный ингибитор, связываясь с сероводородной группой каталитического центра СДГ, ингибируя тем самым его активность [95]. Малонат, как и сукцинат по своей молекулярной структуре, представляет собой дикарбоксилат и также является конкурентным ингибитором СДГ [88]. Особенности структуры малоната заставляют его непосредственно связываться с катионными аминокислотными остатками в сайте связывания субстрата субъединицы СДГ2 [87]. Это специфическое взаимодействие вызывает

ингибирование сложного ферментативного процесса СДГ и приводит к накоплению сукцината, α -кетоглутарата и цитрата [88], влияя на нормальное функционирование метаболического пути ЦТК и поток электронов к ЭТЦ и, следовательно, митохондриальное дыхание. Другие дикарбоновые кислоты, такие как сукцинил-КоА фермент сукцинил-коэнзим А-синтетаза катализирует превращение сукцинил-КоА и АДФ (или ГДФ) в CoASH, сукцинат и АТФ (или ГТФ), процесс, также известный как «фосфорилирование на уровне субстрата» (SLP) [107] может косвенно регулировать активность СДГ. Кирни и др. предлагают форму регуляции «с прямой связью» [109], поскольку накопление сукцинил-КоА в митохондриях будет способствовать активации сукцинатдегидрогеназы, фермента, ответственного за окисление продукта деацилирования активатора.

Другой класс ингибиторов СДГ включает такие соединения, как карбоксин, теноилтрифторацетон (ТТФА) и 6-бензоиламинопурин, которые действуют как неконкурентные ингибиторы, связываясь с сайтами, отличными от каталитического центра фермента. Карбоксин, фунгицид, используемый в сельском хозяйстве, связывается с группами железа и серы субъединицы СДГ₂, нарушая перенос электронов внутри ферментного комплекса. Аналогичным образом, ТТФА взаимодействует с сайтом связывания убихинона (сайт Qp) СДГ, предотвращая перенос электронов на убихинон и блокируя ЭТЦ, поскольку ТТФА обладает способностью хелатировать негемовое железо, вероятно, благодаря строгой стерической специфичности в системе сукцинатдегидрогеназы цитохрома b [107]. Что касается 6-бензоиламинопурина, то он ингибирует транспорт электронов именно в кластере 3Fe-4S. [49].

Неорганические одно- и двухвалентные анионы были описаны как положительные модуляторы сукцинатдегидрогеназы, такие как Cl⁻, Br⁻, SO₄⁻², формиат и ClO₄⁻², могут стабилизировать активную конформацию СДГ, вероятно, за счет ионизации гистидиновых остатков, к которым присоединена

флавиновая группа. Таким образом, низкий уровень pH в диапазоне от 5,5 до 7,0 приводит к «спонтанной» активации этого фермента [109]. С другой стороны, ионы Br⁻ могут ингибировать ферментативную активность СДГ посредством двух разных механизмов, которые зависят от концентрации сукцината. При низких концентрациях сукцината происходит конкурентное ингибирование, когда два иона бромидов вытесняют сукцинат из каталитического центра. Этот процесс идет параллельно окислению флавина и приводит к сдвигу в сторону ферментативного окисления из-за отсутствия восстановительной способности. Тогда как при высоких концентрациях сукцината в присутствии Br⁻ ингибирование может быть неконкурентным [45].

Активность сукцинатдегидрогеназы также регулируется наличием таких макромолекул, как АТФ и АДФ, за счет увеличения дыхательной активности и окислительно-восстановительного баланса Q. Эту активацию СДГ можно понимать как косвенное следствие образования АТФ после фосфорилирования АДФ внутри митохондриального матрикса или через активность аденилаткиназы в межмембранном пространстве. Однако, экспериментальный анализ этих наблюдений показывает, что активность СДГ стимулируется непосредственно АДФ/АТФ и происходит на цитоплазматической стороне внутренней мембраны митохондрии [35].

Как упоминалось выше, наночастицы железа (НЧ-Fe) косвенно модулируют активность сукцинатдегидрогеназы в растениях канолы. При обработке НЧ-Fe наблюдалось повышение активности дыхательных ферментов исследуемого растения и, как следствие, усиливался метаболизм цикла Кребса. Это улучшение активности респираторных ферментов, особенно СДГ, потенциально способствовало ускорению роста растений канолы. Повышение активности СДГ, индуцированное НЧ железа в растениях, связано с активацией антиоксидантной системы. Эта активация привела к значительному снижению содержания пероксида водорода (H₂O₂), предотвращая иницирование окисления тиоловых групп в ферментах [154].

Другой тип регуляции функционирования СДГ осуществляется посредством посттрансляционных модификаций, которые можно разделить на четыре типа; фосфорилирование, деацетилирование, сукцинирование и пропионирование.

Фосфорилирование или дефосфорилирование осуществляется преимущественно ферментами тирозинкиназного типа и может влиять на каталитическую функцию субъединицы СДГ1, а также на перенос электронов по электрон-транспортной цепи у различных организмов. Примером этого является тирозинкиназа (FGR), которая нацелена на положение СДГА Y535 и Y596 у крыс, и ее активация за счет активных форм кислорода (АФК) играет решающую роль в метаболических корректировках в таких условиях, как ограничение питательных веществ, гипоксия/реоксигенация и активация Т-клеток [34]. Другая митохондриальная тирозинкиназа (c-Src) фосфорилирует NDUFV2 и СДГА в дыхательных комплексах I и II. Фосфорилирование NDUFV2 влияет на дыхание и содержание АТФ, тогда как фосфорилирование СДГА, не изменяя ферментативную активность, нарушает перенос электронов, приводя к образованию активных форм кислорода. Обе киназы способствуют регуляции СДГ при различных обстоятельствах. Кроме того, митохондриальные фосфатазы, такие как РТРМТ1, противодействуют активности киназы, дефосфорилируя СДГА и влияя на утилизацию глюкозы митохондриями у *Danio rerio* [143].

Ацетилирование обычно связано с добавлением или удалением ацетильных групп к остаткам лизина. Эти модификации могут влиять на несколько белков в различных клеточных процессах. У млекопитающих флавопротеин сукцинатдегидрогеназа (СДГА) действует как субстрат для НАД⁺-зависимой деацетилазы (SIRT3). SIRT3 — важная митохондриальная деацетилаза, ответственная за деацетилирование различных метаболических ферментов и компонентов окислительного фосфорилирования [57]. Исследование, проведенное на мышах, показало, что СДГА подвергается

ацетилированию по определенным остаткам лизина. Деацетилирование СДГА с помощью SIRT3 усиливает активность комплекса II, влияя на вход субстрата в его активный центр, что указывает на регуляторную роль ацетилирования в митохондриальном метаболизме.

Сукцинирование и пропионирование — две недавно обнаруженные посттрансляционные модификации, влияющие на боковые цепи лизина и на структуру и функцию белка. Сукцинирование происходит в нескольких белках, включая СДГА и СДГВ, и сайты сукцинирования не перекрываются с уже идентифицированными сайтами ацетилирования, что позволяет предположить дифференциальную регуляцию. SIRT5 и CobV участвуют в десукцинировании лизина у млекопитающих и бактерий соответственно. SIRT5 в первую очередь ингибирует комплексы респираторных белков, включая СДГ. Недавно выявленное пропионирование в СДГА ожидает дальнейших исследований из-за его регуляторного значения в функции и сохранении СДГ у развитых организмов [139].

1.2 Молекулярно-эпигенетические аспекты функционирования СДГ

Сукцинатдегидрогеназа действует как белок-посредник между двумя важными метаболическими процессами в развитии растений: ЦТК, где она дегидрирует янтарную кислоту и переносит электроны через ЭТЦ для синтеза энергии [11]. У высших растений четыре субъединицы, составляющие белок СДГ, кодируются в ядерном геноме мультигенным семейством. Таким образом, субъединица СДГ1 кодируется двумя генами: *SDH1-1* и *SDH1-2*; Субъединица СДГ2 – тремя генами: *SDH2-1*, *SDH2-2* и *SDH2-3*; Субъединица СДГ3 - двумя генами, *SDH3-1* и *SDH3-2*; и субъединица СДГ4 - ген *sdh4*. Согласно исследованиям Фигероа и др, два гена *SDH1-1* и *SDH1-2* высококонсервативны у разных организмов и, следовательно, они кодируют белки с похожими аминокислотными последовательностями [78]. Кроме того, данные

структурные сходства полипептидов субъединицы 1 отражаются также в способности связываться с кофактором ФАД и субстратом, в данном случае сукцинатом. Аналогичным образом, гены *sdh2-1* и *SDH2-2* также имеют схожие структуры и, как следствие, кодируют белки, мало отличающиеся друг от друга. Однако, *SDH2-3* структурно отличается от *SDH2-1* и *SDH2-2* и представляет собой ген с высокоспецифичной экспрессией, зависящей от ткани и стадии развития растения [117]. В отличие от субъединиц, составляющих каталитический центр СДГ, межмембранные субъединицы СДГ3 и СДГ4 различаются по своим аминокислотным последовательностям у разных видов, но их структура и функции сохраняются.

Мутации в генах, кодирующих субъединицы, входящих в состав СДГ, непосредственно влияют на активность этого фермента и его регуляторную способность в ЦТК, приводя к накоплению сукцината, изменению содержания других органических кислот, скорости дыхания митохондрий. Как упоминалось выше, наличие изоформ СДГ зависит от ткани или органа, поэтому изменения в кодирующих их генах вызывают дифференциальные физиологические перестройки. В арабидопсисе, изменения гена *SDH1-2* в корнях оказывают минимальное влияние на рост растений, возможно, из-за низкого уровня его экспрессии. Однако, изменение *SDH1-1* влияет на развитие гаметофитов, приводя к снижению продукции семян главным образом потому, что транскрипты *SDH1-1* специфически экспрессируются в цветах и, таким образом, подчеркивают его важную роль в развитии гаметофитов [117]. Снижение активности СДГ наблюдалось у гетерозиготных мутантных растений *SDH1-1/sdh1-1*, однако растения демонстрировали более высокие скорости ассимиляции CO₂ и ускоренный рост по сравнению с контрольными растениями. Это улучшение коррелировало с большей открытостью и плотностью устьиц, что указывает на лучшее поглощение CO₂, в то время как другие фотосинтетические и метаболические параметры не показали существенных различий. Кроме того, растения с дефицитом СДГ показали

лучший рост в условиях ограничения азота, что позволяет предположить, что незначительные метаболические изменения могут влиять на такие важные процессы, как функция устьиц и ассимиляция азота [81]. *SDH1-1* также участвует в реакции растений на патогены. Анализ метаболомики и экспрессии генов в хлопке, инокулированном *Verticillium dahliae*, показал, что *GhSDH1-1* в корнях демонстрирует значительную активацию после инокуляции и индукцию салициловой кислотой. Функциональный анализ показал, что хлопок с подавленным *GhSDH1-1* проявляет большую восприимчивость из-за вовлечения иммунной системы и повреждения сигнального пути салициловой кислоты, а в *Arabidopsis*, сверхэкспрессирующий *GhSDH1-1*, проявляет большую устойчивость к *V. dahliae* [199].

Исследования, проведенные Li et al. у *Oryza sativa* показали, что ген *OsSDH2-1* важен в процессе развития растений, особенно в формировании листьев и старении, а также в производстве зерна [118]. Araujo et al. в экспериментах, проведенных на *Solanum lycopersicum*, наблюдались, что сверхэкспрессия мутанта *SlSDH2-2* улучшает фотосинтез в результате лучшей метаболической ассимиляции доступного CO₂ по сравнению с контрольными растениями. Кроме того, так же было отмечено высокие скорости транспирации и устьичной проводимости. Скорость цикла трикарбоновых кислот снижается, что вызывает изменение уровня метаболитов, о чем свидетельствуют низкие концентрации фумарата и малата [37].

Регуляция экспрессии генов у растений, как и у других высших эукариот, представляет собой сложный и важный процесс для клеточного функционирования и адаптации организмов к физиологическим и экологическим условиям. Экспрессия генов может иметь дифференциальный характер, то есть каждый ген может проявлять неодинаковые уровни экспрессии в зависимости от ткани или органа, стадии развития растения или в ответ на различные стимулы окружающей среды [166, 22]. Однако, когда

наблюдаются сходные паттерны экспрессии, считается, что эти гены находятся в совместной регуляции. Известно несколько уровней, на которых регулируется экспрессия генов, таких как транскрипция, процессинг РНК, трансляция и посттрансляционная модификация белков [148]. Но, вне всякого сомнения, той формой регуляции экспрессии генов, которая произвела революцию в способах интерпретации взаимоотношений генов с окружающей средой, является эпигенетическая регуляция. Эпигенетическая регуляция не включает изменений в последовательности ДНК или в каких-либо ее транскрибируемых продуктах. Одной из наиболее распространенных форм эпигенетической регуляции является метилирование ДНК, которое может активировать или стимулировать экспрессию генов [22].

1.2.1 Эпигенетическая регуляция у высших растений

Изучение эпигенетики растений со временем развивалось: от первых открытий менделевского генетического поведения до фундаментальных открытий в отношении белков, модифицирующих хроматин, и РНК, которые регулируют экспрессию генов у эукариот. Разнообразие эпигенетических путей у растений удивительно и играет решающую роль в фенотипической пластичности постэмбрионального развития, позволяя растениям адаптироваться и выживать в изменяющейся среде [32]. Растения демонстрируют замечательное свойство эпигенетической регуляции, используя все основные её механизмы, известные у эукариот. При этом разрабатывают регуляторные пути на уровне, не имеющем аналогов у других организмов [181].

У высших растений среди различных способов регуляции активации или деактивации транскрипции генов необходимо учитывать метилирование промотора [68]. Метилирование ДНК в определенных последовательностях цитозина является одним из основных механизмов эпигенетической регуляции

в различных условиях развития растений [23]. Степень метилирования ДНК обеспечивает платформу для связывания белковых комплексов, которые модифицируют гистоны, тем самым изменяя структуру хроматина и доступность генетической информации [27]. Этот процесс происходит в различных контекстах последовательностей в геномах растений, отражая динамический баланс между ферментативными активностями, которые устанавливают, поддерживают или удаляют метилирование [195].

Ферменты, модифицирующие гистоны, также играют решающую роль в эпигенетической регуляции у растений, влияя на эпигенетические состояния посредством добавления или удаления посттрансляционных меток гистонов. Модификации гистонов, такие как ацетилирование, метилирование, сумойлирование, убиквитинирование и фосфорилирование, регулируют доступность транскрипционного аппарата к определенным участкам генома, тем самым контролируя экспрессию генов [20]. Эти модификации влияют не только на структуру хроматина, но и на рекрутирование белков, участвующих в таких процессах, как транскрипция, репликация и репарация ДНК [180].

РНК-опосредованное замалчивание генов является еще одним ключевым эпигенетическим механизмом у растений, включающим скоординированное действие различных классов некодирующих РНК, таких как малые РНК и длинные некодирующие РНК. Эти РНК могут модифицировать структуру хроматина и подавлять транскрипцию, образуя каркасы РНК, к которым прикрепляются гистоновые белки и ДНК-метилтрансферазы. У растений пути РНК-интерференции опосредуются миРНК, микроРНК и кРНК, выступающие регуляторами экспрессии генов [189].

Как уже было описано, растения имеют множество механизмов эпигенетической регуляции, которые взаимодействуют друг с другом и, таким образом, гарантируют нормальную работу генетических функций на многих уровнях [94]. Активация этих регуляторных путей влияет на изменения в

структуре хроматина и доступности ДНК и, в конечном итоге, на экспрессию генов [181]. Точная регуляция этих эпигенетических процессов необходима для того, чтобы растения могли адаптивно реагировать на различные стимулы окружающей среды и развития, обеспечивая тем самым их выживание и размножение в изменяющихся условиях окружающей среды [32].

1.2.1.1 Метилирование ДНК

Как мы упоминали ранее, метилирование ДНК является «важным процессом эпигенетической регуляции, оно происходит посредством избирательного добавления $-CH_3$ групп к остаткам цитозина в определенных последовательностях цепи ДНК». [42]. Эта химическая модификация происходит главным образом в пятом положении углерода цитозина, что приводит к образованию 5-метилцитозина [23]. Для того чтобы произошло метилирование ДНК, необходимы два важнейших субстрата: цитозин и кофактор S-аденозил-L-метионин (SAM) [47]. Ферменты ДНК-метилтрансферазы (DNMT) ответственны за катализацию этой реакции и используют ключевые остатки, такие как Cys-1226 и Glu-1266, для стабилизации активного центра.

Процесс метилирования включает в себя ряд скоординированных шагов. Первоначально цитозин стабилизируется в активном центре за счет взаимодействия с остатком Glu-1266. Остаток Cys-1226 затем действует как нуклеофил, атакуя 6-й атом углерода цитозина, вызывая серию перегруппировок в двойных связях кольца. Эта перегруппировка облегчает перенос протона между остатком Glu-1266 и азотом 3 цитозина. Присутствие кофактора SAM в активном центре облегчает алкилирование цитозина, приводящее к образованию 5-метилцитозина. Впоследствии неизвестный основной остаток депротонирует углерод 5 цитозина, восстанавливая

ароматичность кольца. Наконец, комплекс ДНК-белок диссоциирует, в результате чего образуется метилированный цитозин [194].

В контексте высших растений метилирование ДНК представляет собой разнообразные закономерности, включая метилирование CG, CHG и CHH (где H представляет собой аденин, цитозин или тимин). Хотя преимущественно наблюдается метилирование CG, метилирование CHG и CHH также играет важную роль в эпигенетической регуляции [151]. У таких растений, как арабидопсис, за поддержание метилирования в этих контекстах отвечают различные ферменты. Например, ДНК-метилтрансфераза 1 (MET1) отвечает за метилирование CG, а хромометилазы 2 и 3 (CMT2 и CMT3) и ДНК-метилтрансферазы *de novo* DRM1 и DRM2 участвуют в метилировании CHG и CHH. Распределение этих ферментов варьируется в зависимости от вида растений. Например, у *Oryza sativa* идентифицированы две изоформы MET и две изоформы ШМТ, а у *Zea mays* обнаружена только одна изоформа MET и две хромометилазы. Биологические функции гомологичных белков семейства DRM еще полностью не выяснены у таких видов, как *O. sativa* и *Z. Mays* [42].

Следует отметить, что у растений метилирование ДНК избирательно локализуется в определенных генах и элементах генома. Хотя гены обычно метилируются по CG внутри их тела, последовательности мобильных элементов, как правило, метилируются по нескольким сайтам CG, CHG и CHH [151]. Это метилирование в мобильных элементах и промоторных областях приводит к «молчанию» генов, тогда как метилирование внутри тел генов может индуцировать экспрессию генов. Таким образом, метилирование ДНК имеет двойное воздействие: оно влияет на интенсивности экспрессии генов и одновременно защищает геном от дерегулируемой активности мобильных элементов [79].

1.2.1.2 Роль метилирования ДНК в регуляции экспрессии генов

Регуляция генов — фундаментальный процесс, определяющий экспрессию генов в клетках, и одним из ключевых эпигенетических механизмов, участвующих в этой регуляции, является метилирование ДНК [180]. Этот процесс может оказывать различное влияние на транскрипцию генов в зависимости от места метилирования в геноме. В большинстве случаев при метилировании промотора гена обычно наблюдается ингибирование транскрипции. Это может происходить напрямую, предотвращая связывание активаторов транскрипции, или косвенно, способствуя связыванию репрессоров транскрипции [27].

С другой стороны, существует менее изученный феномен, при котором метилирование промотора может активировать транскрипцию генов. Предполагается, что это может происходить за счет усиления связывания некоторых активаторов транскрипции или ингибирования связывания репрессоров транскрипции [195]. Однако, точные молекулярные механизмы еще не до конца понятны и требуют для своего выяснения дополнительных исследований.

Важно отметить, что метилирование ДНК на промоторах обычно является результатом диффузии механизмов метилирования из транспозонов и других близлежащих повторов. Эти элементы также являются мишенями механизмов активного деметилирования ДНК для защиты генов от подавления транскрипции. В ситуациях, когда гены активируются путем метилирования ДНК промотора, активное деметилирование может привести к подавлению транскрипции этих генов [132].

Другим важным аспектом является метилирование ДНК в полноразмерной кодирующей области, которое обычно происходит в центральных экзонах. В отличие от метилирования промотора, которое может подавлять или уменьшать транскрипцию гена, метилирование в кодирующей области может ингибировать элонгацию транскрипции, что приводит к образованию меньшего и, возможно, неактивного транскрипта [91].

Внутригенное метилирование также играет важную роль в регуляции экспрессии генов, предотвращая активацию скрытых сайтов начала транскрипции. В меристематических клетках растений абберрантная транскрипция может производить двухцепочечные РНК, которые запускают механизм метилирования по принципу обратной связи и подавляют скрытые промоторы, из которых они произошли. Это метилирование сайтов начала скрытой транскрипции поддерживается в дифференцированных тканях, где хроматин сохраняет свою недоступную структуру, а абберрантная транскрипция подавляется [132].

Модификация ДНК в разных клетках и тканях динамически регулируется в процессе роста и развития растений, а также в различных условиях окружающей среды [32]. Это указывает на решающую роль модификаций ДНК в регуляции экспрессии генов и в физиологических процессах растений. Модификации оснований, происходящие в промоторе, близлежащих регионах и внутри тела гена, могут влиять на экспрессию гена. Как правило, модификации оснований ДНК подавляют транскрипцию генов; однако в некоторых случаях это также может способствовать транскрипции гена [27, 32].

1.2.1.3 Эпигенетические модификации метаболизма растений в условиях абиотического стресса

Метилирование ДНК и модификации гистонов — фундаментальные эпигенетические процессы, которые могут влиять на адаптацию растений к неблагоприятным условиям окружающей среды [32]. Недавние исследования тщательно изучили роль метилирования ДНК в реакции растений на широкий спектр абиотических стрессов, включая жару, холод [3, 4], засуху [191], засоление [65] и другие. Эти исследования, охватывающие различные виды растений, выявили закономерности вызванного стрессом метилирования и/или

деметиляции ДНК, как глобально, так и в конкретных локусах [114]. Кроме того, наблюдалась связь между изменениями в метилировании ДНК и регуляцией транскрипции генов, участвующих в реакциях на стресс [5]. В настоящее время одно из многочисленных направлений исследований направлено на понимание того, как определенные факторы окружающей среды могут влиять на способность растений реагировать на стресс или «стрессовую память» [165] и какую роль в этом процессе играет метилирование генов. Документально подтверждено, что метилирование ДНК может изменяться в условиях стресса, необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить, являются ли эти изменения адаптивными и способствуют выживанию и продуктивности растений в неблагоприятных условиях.

Экологические стрессы вызывают у растений эпигенетические реакции, о чем свидетельствуют изменения в метилировании ДНК, которые могут проявляться как гипер- или гипометилирование [176]. Как уже говорилось выше, эти эпигенетические процессы существенно влияют на модуляцию экспрессии генов у растений, подвергающихся различным видам абиотического стресса [114].

Метилирование промотора и тела гена становится ключевым механизмом регуляции экспрессии генов в ответ на этот тип стресса, демонстрируя генотип- и органозависимую специфичность. У *Brassica oleracea* в условиях низкотемпературного стресса отмечено снижение степени метилирования ДНК промоторной области гена CBF, что согласуется с уровнями генетической экспрессии [3]. Также было отмечено, что уровни метилирования исследуемого гена восстанавливаются при переносе растений в благоприятные условия роста, вероятно, за счет системы DME/ROS1, обеспечивающей обратимое деметилирование/метилирование соответствующих последовательностей ДНК [4]. В условиях гипоксии в промоторной области генов, кодирующих белок глутаматдегидрогеназы у растений кукурузы, наблюдалось, что изменения профиля метилирования

промоторов генов *GDH1* и *GDH2* обратно пропорциональны уровням экспрессии этих генов [6]. Исследования на соевых бобах выявили факторы транскрипции, которые положительно реагируют на солевой стресс и контролируются изменениями в метилировании ДНК, включая MYB, b-ZIP и членов семейства AP2/DREB. Активация этих метилированных факторов транскрипции коррелирует с модификациями гистонов, такими как повышенное триметилирование гистонов H3K4 и ацетилирование H3K9, что свидетельствует о взаимосвязи между метилированием ДНК и модификациями гистонов в ответ на солевой стресс [172]. В исследованиях на рисе было обнаружено, что глобальные уровни метилирования ДНК варьируются в зависимости от солевого стресса, при этом большая возможность настройки метилирования ДНК связана с большей устойчивостью к стрессу [77]. Анализ эпигенома в популяциях *Arabidopsis thaliana* выявил существование количественных эпигенетических локусов, связанных с метилированием ДНК, что показывает корреляцию между этим и адаптацией растений. Общегеномные различия в уровнях метилирования ДНК связаны с географическим происхождением, а также с дифференциальной экспрессией генов, индуцированной эпиаλληлями, что подчеркивает сложное взаимодействие между метилированием ДНК и адаптацией к окружающей среде [151].

1.2.1.4 Метилирование промоторов и регуляция экспрессии генов, кодирующих СДГ

За последнее десятилетие были проведены обширные исследования экспрессии генов и метилирования промоторов генов, кодирующих различные субъединицы сукцинатдегидрогеназы у растений. Эти исследования затронули широкий спектр аспектов: от динамики изменения статуса метилирования до его связи с транскрипционной активностью на разных стадиях роста и

развития растений. Кроме того, было изучено влияние различных условий окружающей среды, таких как свет и аноксия, на эпигенетическую регуляцию экспрессии этих генов.

Выявлены сложные закономерности метилирования промоторов генов СДГ, которые тесно связаны с профилями экспрессии их генов. Было обнаружено, что изменения уровней метилирования коррелируют с изменениями транскрипционной активности этих субъединиц СДГ, что указывает на важную роль метилирования ДНК в тонкой регуляции функции митохондрий и энергетического метаболизма в клетках [70, 67, 71, 69, 66].

В первые дни прорастания семян *Zea mays* наблюдалась тесная связь между эпигенетической регуляцией и экспрессией генов, кодирующих флавопротеиновую субъединицу сукцинатдегидрогеназы. Для генов *SDH1-1* и *SDH1-2* активная транскрипция была очевидна в течение первых пяти дней, что совпадало с низким метилированием в их промоторных областях. Однако, начиная с шестого дня, уровень метилирования значительно увеличился, достигнув 75% и 50% для *SDH1-1* и *SDH1-2*, соответственно. Такое сильное метилирование промотора *SDH1-1* заметно подавляло его транскрипцию, в то время как метилирование *SDH1-2* не полностью ингибировало экспрессию гена, оставаясь на уровне 30% от максимума на 10-й день. Эти различия во взаимосвязи между метилированием CpG-островков и экспрессией генов могут быть связаны главным образом с вариациями последовательностей промоторов и совместной регуляцией этих генов, возможно, под влиянием требований синтеза специфических пептидов, участвующих в метаболических процессах во время пищевой адаптации [70]. С другой стороны, в генах, кодирующих субъединицу 2 СДГ, наличие CpG-островков наблюдалось в промоторах *SDH2-1* и *SDH2-2*, но не в *SDH2-3*, что указывает на различия в способности их регуляции. Для *SDH2-1* обнаружено изменение уровней метилирования внутри CpG-островка, в то время как другие нуклеотиды CG сохраняют свой статус метилирования. Напротив, для *SDH2-2* уровни

метиляции в целом усиливаются, а в *SDH2-3* данный показатель остается стабильным [67]. С другой стороны, в отличие от генов, кодирующих СДГ1 и СДГ2, промоторы генов *SDH3-1* и *SDH3-2*, кодирующих третью субъединицу СДГ, гиперметилованы с первого дня. Однако, эти уровни метилирования значительно снижаются в следующие 8 дней для обоих генов. Кроме того, наблюдалась прямая связь между статусом метилирования CpG-островков в промоторе *SDH3-2* и количеством транскриптов этого гена, что позволяет предположить метаболическую адаптацию во время прорастания [71].

Исследования на листьях кукурузы показали, что экспрессия и метилирование промоторов генов, кодирующих СДГ, светочувствительны. Под действием света экспрессия генов *SDH1-2*, *SDH2-3*, *SDH3-1* и *SDH4* снижается по сравнению с темнотой. В условиях красного и дальнего красного света гены, кодирующие каталитические субъединицы, наиболее регулируются, в отличие от субъединиц 3 и 4. Ген *SDH1-2* особенно чувствителен к белому и красному свету, значительно снижая его экспрессию и демонстрируя увеличение метилирования промотора. С другой стороны, *SDH2-3* демонстрирует снижение экспрессии при стабильном метилировании промотора. Хотя для *SDH3-1* и *SDH4* наблюдаются различия в метилировании промотора, об изменениях в их экспрессии не сообщается [69].

В бескислородных условиях *SDH1-2* демонстрирует низкое метилирование промотора на воздухе, но оно увеличивается до 50% через 3 часа в N₂, оставаясь после этого на высоком уровне, а экспрессия *SDH1-2* немного снижается после 6 часов экспозиции. В атмосфере CO₂ экспрессия незначительна даже через 3 часа, но метилирование промотора значительно возрастает только через 24 часа. *SDH2-3* демонстрирует более низкую экспрессию в атмосфере N₂ с небольшим увеличением метилирования промотора. В CO₂ его экспрессия снижается еще больше, хотя и не коррелирует с метилированием промотора. С другой стороны, *SDH3* экспрессируется

примерно на 50% как в атмосфере N_2 , так и в CO_2 по сравнению с воздухом и не коррелирует со скоростью метилирования [66].

Таким образом, исследования экспрессии генов и метилирования промотора генов СДГ у растений обеспечили более глубокое понимание регуляторных механизмов, которые контролируют функцию митохондрий и энергетический метаболизм в ответ на физиологические изменения и условия окружающей среды. Эти результаты не только расширяют наши знания о молекулярной биологии растений, но также имеют важное значение для улучшения устойчивости сельскохозяйственных культур в контексте изменения климата.

1.3 Абиотический стресс и влияние солевого стресса на метаболизм растений

Засоление вызвано главным образом чрезмерным накоплением солей в почве и представляет собой критический фактор, оказывающий существенное влияние на рост и развитие растений, затрагивая такие фундаментальные процессы, как прорастание, развитие семян, рост, цветение и плодоношение [201]. Поскольку $NaCl$ является наиболее растворимой и распространенной солью, она вызывает солевой стресс, из-за того, что ограничивает поглощение воды и питательных веществ растением [2]. Дефицит воды и дисбаланс питания приводят к первичному стрессу у растений, поэтому они сталкиваются с необходимостью задействовать адаптивные механизмы, чтобы выжить и процветать в среде с высокой соленостью. В основном этот вид стресса индуцирует повышение внутриклеточного осмотического давления и, как следствие, накопление ионов Na^+ в токсических количествах [90]. В ответ на сигналы солевого стресса растения как неподвижные организмы реализуют различные регуляторные и адаптивные механизмы; например, регуляция ионного гомеостаза, активация пути осмотического стресса, опосредование

передачи сигналов растительных гормонов и модуляция динамики цитоскелета и состава клеточной стенки (Рис. 3) [90]. В целом солевой стресс вызывает разнообразные физиологические и молекулярные изменения, препятствуя росту растений за счет ингибирования фотосинтеза, сокращения доступных ресурсов и подавления деления и расширения клеток [19]. Также он влияет на образование светопоглощающих комплексов и регулирует переходы состояний фотосинтетического аппарата [131]. Поэтому очень важно расшифровать механизмы, лежащие в основе этих физиологических и биохимических реакций на солевой стресс; эти результаты могут предложить ценные стратегии для улучшения урожайности сельскохозяйственных культур.



Рис. 3. Влияние солевого стресса на метаболизм растений.

1.3.1 Осмотический стресс

Вредное воздействие засоления на растения вначале проявляется в виде кратковременного осмотического стресса, а в дальнейшем – в накоплении токсичных ионов в растительных тканях [90]. Осмотический стресс,

вызываемый в основном хлоридом натрия, возникает на начальном этапе их воздействия из-за постепенного поглощения ионов и последующего снижения водного потенциала вокруг корневой зоны, что приводит к уменьшению проводимости воды в растительных клетках, скорости роста растений и развитию новых листьев, причем этот орган является одним из наиболее чувствительных над корнями [2]. Длительное воздействие высокой солености вызывает накопление токсичных ионов, таких как Na^+ , Cl^- и SO_4^{2-} , которые стимулируют ионную токсичность и ухудшают усвоение питательных веществ, увеличивая повреждение растительных клеток и тканей [40].

В ответ на это, у растений появляются различные защитные механизмы, позволяющие справиться с уменьшением доступности H_2O и увеличением концентрации токсичных ионов. Эти механизмы зависят от осмотических сигнальных путей, которые регулируют различные процессы, такие как генетическая экспрессия и активация ферментов, участвующих в биосинтезе осмопротекторов. Основными осмолитами, накапливающимися в условиях солевого стресса, являются низкомолекулярные органические соли, такие как пролин, глутамат, глицин-бетаин, полиолы и углеводы, которые обладают функцией снижения осмотического потенциала и давления в цитозоле [170]. Эти осмолиты также служат сигнальными молекулами, индуцирующими накопление гормонов, таких как абсцизовая кислота (АБК, АВА), которые являются сигнальными молекулами, активирующими синтез различных белков, связанных с регуляцией развития растений в условиях засоления. [201].

1.3.2 Ионный стресс

В условиях солевого стресса напрямую на ионный баланс в растительных клетках, главным образом, влияет накопление ионов натрия. Постепенное увеличение концентрации Na^+ до токсичного уровня изменяет

ионный гомеостаз, то есть, транспорт ионов. Известно, что транспорт ионов натрия в растительные клетки происходит пассивно и неселективно [26]. При высокой концентрации ионов Na^+ во внеклеточном пространстве генерируются изменения электрохимического потенциала плазматической мембраны, перемещающие Na^+ в сторону цитоплазмы [18]. При солевом стрессе происходит деполяризация мембранных потенциалов, что приводит к исключению ионов Cl^- и K^+ , влияя на адекватное соотношение K^+/Na^+ для поддержания низкого уровня натрия и высокого уровня калия в цитоплазме, что предотвращает повреждение клеток и дефицит питательных веществ в условиях солевого стресса. Чтобы поддерживать приемлемый уровень Na^+ , растения разработали различные системы удаления Na^+ из цитоплазмы [126].

Вытеснение Na^+ из клеток — основной метод борьбы растений с солевым стрессом. Этот процесс, в отличие от абсорбции Na^+ , является активным, и основной путь его исключения проходит через антипортеры Na^+/H^+ , которые транспортируют Na^+ в обмен на H^+ . Антипортеры Na^+/H^+ , расположенные в плазматической мембране, транспортируют Na^+ в апопласт, а антипортеры Na^+/H^+ , расположенные в вакуоли, ответственны за поддержание компартментализации Na^+ в вакуолях [24]. Кроме того, одним из наиболее важных путей вытеснения избытка Na^+ является Ca^{2+} -зависимый (SOS), который состоит из Ca^{2+} -белков SOS1, SOS2, SOS3, ответственных за обнаружение и декодирование сигналов кальция в цитозоле, стимулируемом избыточной соленостью [80].

Растения, «ощущая» Na^+ и гиперосмолярность, накапливают Ca^{2+} , активируют передачу сигналов активных форм кислорода (АФК) и изменяют свой фосфолипидный состав. Эти сигналы активируют адаптивные процессы для облегчения солевого стресса, включая поддержание ионного баланса и осмотического гомеостаза, индукцию передачи сигналов фитогормонов, а также регуляцию динамики цитоскелета и структуры клеточной стенки. Впоследствии с помощью ряда путей передачи сигнала рост растений

замедляется и активируется метаболизм, повышающий солеустойчивость [126].

1.3.3 Окислительный стресс

Окислительный стресс, вызванный засоленностью, является следствием воздействия ионного и осмотического стресса. Увеличение концентрации ионов Na^+ и Cl^- вызывает накопление активных форм кислорода, которые представляют собой частично восстановленные формы O_2 , обладающие высокой радикальной реакционной способностью; супероксид (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2) или гидроксильный радикал (OH^\bullet) [110]. Высокие концентрации АФК напрямую влияют на нормальное функционирование растительных клеток, вызывая окислительное повреждение биологических молекул в клеточной мембране, таких как липиды, белки и нуклеиновые кислоты. O_2^- может окислять определенные аминокислоты, такие как гистидин, метионин и триптофан. Он также вызывает перекисное окисление липидов, тем самым ослабляя клеточные мембраны. H_2O_2 может окислять SH-группы. Биологическая токсичность H_2O_2 может увеличиваться в присутствии металлических катализаторов в результате реакций типа Габера-Вейсса или Фентона. Гидроксильный радикал (OH^\bullet) обладает очень высоким сродством к биологическим молекулам в месте своего синтеза, реагируя со скоростями, практически контролируемые диффузией [29]. В условиях высокой солености резко возрастает продукция АФК и изменяется физиологический гомеостаз клетки. Высшие растения развили сложную систему защиты от окислительного стресса, вызванного АФК, состоящую из низкомолекулярных антиоксидантов, включая каротиноиды, аскорбат, глутатион и токоферол, а также антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутазы, каталазы и глутатион-аскорбатный цикл [31].

1.3.4 Влияние засоления на функциональность цикла трикарбоновых кислот

Цикл лимонной кислоты или цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) является «центральным компонентом метаболизма и клеточного дыхания» [115]. Он обеспечивает синтез углеродных скелетов, необходимых для биосинтеза аминокислот, жирных кислот, нуклеиновых кислот и вторичных метаболитов [161]. Кроме того, он также обеспечивает восстанавливающие молекулы, необходимые для синтеза дыхательного АТФ в ЭТЦ [200]. Ферменты и интермедиаты, участвующие в ЦТК, широко изучены (табл. 1). Однако биохимические и регуляторные изменения на молекулярном уровне этих белков в условиях солевого стресса у высших растений еще далеки от понимания, поскольку ЦТК регулируется на нескольких этапах цикла в зависимости от условий окружающей среды, стадий развития и видов растений. Следовательно, необходимы дополнительные исследования для выяснения адаптивной способности ЦТК в условиях абиотического стресса. Исследования, проведенные на растительных тканях, показывают заметное изменение активности ферментов, участвующих в ЦТК, в ответ на засоление у разных видов растений.

Цитратсинтаза (ЦС) (КФ 2.3.3.1) представляет собой гомодимерный белок, условно обозначаемый как первый фермент ЦТК, осуществляющий необратимую конденсацию ацетил-КоА с оксалоацетатом с образованием цитрата. Фактически, реакция в высокой степени экзергоническа и определяет скорость полного цикла. Цитрат — одна из органических кислот, содержание которой уменьшается или увеличивается в условиях солевого стресса в листьях пшеницы и ячменя [187, 50]. У солечувствительных генотипов *Flueggea suffruticosa* активность цитратсинтазы снижается, а у солеустойчивых генотипов активность этого фермента повышается, что обусловлено увеличением содержания пировиноградной и лимонной кислот в

процессе прорастания, что позволяет предположить, что дыхательный метаболизм солеустойчивого *F. suffruticosa* был усилен, чтобы избежать подавления прорастания семян в условиях солевого стресса [190].

На уровне аконитазы (КФ 4.2.1.3) Недавние исследования Черкасских и др. отметили, что «активность этого фермента в листьях пшеницы значительно возрастает в первые часы воздействия на проростки NaCl» [30]. Аналогичные результаты были зафиксированы авторами на листьях кукурузы, где активность митохондриальной аконитазы возрастала в проростках, подвергшихся воздействию NaCl. Динамика активности аконитазы соответствует увеличению концентрации транскриптов гена *ZmACO1*, кодирующего митохондриальную форму аконитазы. Эти изменения в экспрессии гена *ZmACO1* могут быть связаны с разным уровнем синтеза и деградации белка аконитазы в митохондриях, поскольку этот фермент в своих Fe-S группах может быть высокочувствителен к необратимой окислительной инактивации и деградации активным кислородом и азотом, что может привести к снижению его активности [65].

Изоцитратдегидрогеназа (ИДГ) (КФ 1.1.1.41), превращает окисленный НАД (НАДФ) в НАДН (НАДФН) и катализирует окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата. ИДГ считается ключевым ферментом, лимитирующим скорость в цикле трикарбоновых кислот. В двух разных сортах риса МТУ 1010, и Nonabokra, ферментативная активность ИДГ имеет дифференцированный характер в условиях солевого стресса. В МТУ 1010, при инкубации в 100 мМ NaCl, наблюдалось значительное снижение активности ИДГ как в корнях, так и в побегах, на 42% и 36%, соответственно; Для Nonabokra тенденция была противоположная: обнаружено увеличение изучаемого фермента на 37% в корнях и на 32% в побегах по сравнению с контрольными образцами, при идентичных условиях эксперимента [59]. Очевидно, что регуляция активности ИДГ при солевом стрессе зависит от конкретного сорта растений.

На следующей стадии ЦТК, мультиферментный комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназа (ОГДГ) катализирует декарбоксилирование 2-оксоглутарата, получая в качестве продуктов сукцинил-КоА и CO₂, НАД⁺ действует как акцептор электронов, а КоА как переносчик сукцинильной группы. [149]. Это строго регулируемый этап, и чувствительность 2-оксоглутаратдегидрогеназы к NaCl хорошо изучена. Этот ферментный комплекс, как показали *Che-Othman et al.*, ингибируется в условиях засоления, что приводит к накоплению 2-оксоглутарата [51]. Аналогичные результаты наблюдались в стеблях и корнях *Nicotiana tabacum*, инкубированных в 200 мМ NaCl [55]. Однако при изучении регуляции активности 2-ОГДК в листьях кукурузы под влиянием солевого стресса в первые часы инкубации наблюдалось стимулирующее действие хлорида натрия. Анализ уровня транскриптов генов, кодирующих ферменты 2-ОГДК; *ZmOGDH1*, *ZmOGDH2* и *ZmOGDH3* в сравнении с контрольными образцами выявили корреляцию с изменением активности фермента [1].

Накопление 2-оксоглутарата за счет ингибирования одного из компонентов мультиферментного комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы при воздействии соли приводит к активации шунтового метаболического пути (ГАМК-шунт), обеспечивающего альтернативное снабжение углеродом за счет окисления глутамат в сукцинат. Это вызывает дефицит сукцинил-КоА, и поэтому ферментативная активность сукцинил-КоА-синтазы по синтезу сукцината необязательна в условиях засоления. Кроме того, стоит подчеркнуть, что β-субъединица сукцинил-КоА-синтазы напрямую ингибируется в листьях *Solanum lycopersicum*, тогда как функция ГАМК положительно регулируется [174].

В результате активации альтернативного пути ГАМК происходит быстрое увеличение продукции сукцината, которое катализируется белковым комплексом сукцинатдегидрогеназы (СДГ) с получением фумарата. Известно, что количество сукцината увеличивается с третьего дня воздействия на

проростки пшеницы различных концентраций NaCl [50]. Аналогичные результаты установлены в корнях кукурузы [83]. Кроме того, в изолированных митохондриях пшеницы, инкубированных в соли, зарегистрировали важные изменения в содержании белков СДГ1, СДГ2 и СДГ5 [101].

Фумаратгидратаза (ФГ) (КФ 4.2.1.2) или фумараза представляет собой высококонсервативный гомотетрамерный фермент, имеющий две изоформы: митохондриальную и цитозольную. ФГ катализирует обратимую реакцию гидратации/дегидратации фумарата до L-малата. Фумараза стимулируется солевым стрессом в листьях *Zea mays*. Активность фумаразы в митохондриях возрастает в течение 6 ч инкубации с NaCl. В цитозоле активность фумаразы демонстрировала непрерывное снижение во время солевого стресса, вплоть до четырехкратного снижения значений через 12 ч инкубации по сравнению с исходным уровнем. Анализ экспрессии генов фумаразы *ZmFum1* и *ZmFum2*, кодирующих соответственно митохондриальную и цитозольную формы фермента, показал увеличение транскриптов *ZmFum1* в течение первых 6 ч инкубации с NaCl с последующим снижением [65].

Малатдегидрогеназы (МДГ) катализируют обратимое взаимное превращение малата и оксалоацетата с использованием НАД(Н)/НАДФ(Н) в качестве кофактора и регулируют развитие растений и их устойчивость к абиотическому стрессу. Реакция фермента МДГ на засоление исследовалась на различных моделях растений. NaCl (150 мМ) ингибирует НАДФ+МДГ в мезофилле кукурузы в течение первого часа стресса [73]. Однако, в НАДФ-МЭ ферментативная активность возросла после 6 часов инкубации [72]. У *Oryza sativa* экспрессия генов *OsMdh1*, *OsMdh12* индуцировалась в присутствии NaCl в различных тканях [142, 168]. У арабидопсиса сверхэкспрессия *SbNADP-ME* и *ZmNADP-MDH* повышает солеустойчивость проростков. В яблонях сверхэкспрессия *MdcyMDH* улучшает устойчивость к холоду и солевому стрессу за счет создания более восстановительных окислительно-

восстановительных состояний и повышения уровня салициловой кислоты [186, 193].

Таблица 1.

Влияние NaCl на концентрацию метаболитов ЦТК

Метаболит	Организм	Орган	[NaCl] mM	Влияние	Ссылка
Цитрат	<i>Hordeum vulgare</i> <i>L</i>	листья	100	+	[187]
			300	+	[188]
	<i>Glycine max</i>	листья	45	-	[196]
	<i>Triticum aestivum</i>	листья	150	-	[51]
	<i>Zea mays L</i>	побег	150	-	[83]
	<i>Cicer arietinum</i> <i>L.</i>	цветы и стручки	225	+	[61]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	побег	100	+	[92]
Аконитат	<i>Hordeum vulgare</i> <i>L</i>	листья	100	+	[187]
			150	-	[51]
	<i>Cicer arietinum</i> <i>L.</i>	цветы и стручки	225	+	[61]
Изоцитрат	<i>Hordeum vulgare</i> <i>L</i>	листья	100	+	[187]
			300	+	[188]
	<i>Cicer arietinum</i> <i>L.</i>	цветы и стручки	225	+	[61]

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	побег	100	+	[92]
2-оксоглутарат	<i>Triticum aestivum</i>	листья	150	+	[51]
	<i>Hordeum vulgare</i> <i>L</i>	листья	300	-	[188]
	<i>Glycine max</i>	листья	45	-	[196]
	<i>Zea mays L</i>	побег	150	-	[83]
Сукцинат	<i>Hordeum vulgare</i> <i>L</i>	листья	100	+	[187]
			300	-	[188]
	<i>Glycine max</i>	листья	45	+	[196]
	<i>Triticum aestivum</i>	листья	150	+	[51]
	<i>Zea mays L</i>	корень	150	+	[83]
		побег	150	-	[83]
	<i>Cicer arietinum</i> <i>L.</i>	стручки	225	+	[61]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	побег	100	+	[92]
Фумарат	<i>Triticum aestivum</i>	листья	150	-	[51]
	<i>Hordeum vulgare</i> <i>L</i>	листья	300	-	[188]
	<i>Glycine max</i>	листья	45	+	[196]
	<i>Cicer arietinum</i> <i>L.</i>	стручки	225	+	[61]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	побег	100	-	[92]
Малат		листья	100	+	[187]

	<i>Hordeum vulgare</i> <i>L</i>		300	+	[188]
	<i>Triticum aestivum</i>	листья	150	-	[51]
	<i>Glycine max</i>	листья	45	-	[196]
	<i>Zea mays L</i>	корень	150	+	[83]
		побег	150	-	[83]
	<i>Cicer arietinum</i> <i>L.</i>	стручки	225	+	[61]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	побег	100	+	[92]

1.3.5 Электрон-транспортная цепь митохондрий и солевой стресс

Окислительное фосфорилирование – это процесс синтеза АТФ в митохондриальной мембране АТФ-синтазой в результате переноса электронов от НАДН или ФАДН₂ к О₂, создающий электрохимический градиент через внутреннюю мембрану митохондрий за счет транспорта ионов Н⁺ из митохондриального матрикса в межмембранное пространство [46]. Все электроны попадают в ЭТЦ через НАД(Ф)Н (генерируемый различными дегидрогеназами в митохондриальном матриксе или межмембранном пространстве/цитоплазме) или через флавиновые нуклеотиды (ФАДН₂, ФМНН₂), которые обычно связаны с белками, называемыми флавопротеинами. Другими словами, в растениях электроны могут проникать в ЭТЦ четырьмя уникальными путями: I. Путь матричный–НАД(Ф)Н, II. Путь матричный–ФАДН₂, III. Путь межмембранное пространство–НАД(Ф)Н и IV. путь межмембранное пространство–ФАДН₂ [159]. Вклад каждого из этих четырех путей зависит от физиологического состояния клетки и воздействия

биотического и абиотического стрессов. В нормальных условиях циклическая активность ЦТК является основным источником восстановителей для ЭТЦ [41].

Как уже было сказано выше, в процессе окислительного фосфорилирования синтезируется АТФ. Эффективная генерация АТФ митохондриями имеет важное значение для обеспечения энергии, необходимой для механизмов толерантности к засолению в растениях [39]. Солевой стресс напрямую влияет на функциональность белковых комплексов, участвующих в ЭТЦ. В изолированных митохондриях кукурузы активность НАДН: убихиноноксидоредуктазы или комплекса I значительно снижается с увеличением концентрации NaCl. Однако, было также замечено, что функциональность этого ферментного комплекса может быть восстановлена с помощью антиоксидантов, таких как аскорбат, глутатион, каталаза и α -токоферол. С другой стороны, комплекса II менее чувствителен к солевому стрессу из-за присутствия осмопротекторов, таких как пролин и глицин-бетаин [89]. Эти результаты были подтверждены на мезофилле и клетках оболочки амаранта и в листьях шпината, где наблюдалось увеличение каталитической активности СДГ и концентрации пролина [14]. Хотя пролин накапливается при солевом стрессе и обеспечивает защитную функцию комплекса II, его роль в восстановлении после воздействия засоленности, когда в его осмопротекторной функции больше нет необходимости, еще не выяснена. У пшеницы митохондриальное дыхание стимулируется в ответ на NaCl, когда экзогенные НАДН и сукцинат были предоставлены в качестве субстрата, а поток электронов был связан с генерацией протонного градиента через внутреннюю мембрану, поддерживая эффективность окислительного фосфорилирования и общую потребность в энергии во время стрессовых состояния [101]. Митохондриальные ЭТЦ растений имеют два альтернативных пути транспорта электронов, известные как путь цитохром-с-кислород: оксидоредуктаза, чувствительный к цианиду / антимицину А, и путь

альтернативная оксидаза (АО), чувствительный к цианиду салицилгидроксамовой кислоте (SHAM) [177]. Хотя поток электронов по пути цитохромоксидазы связан с выработкой АТФ, транспорт электронов по пути АО не сохраняет энергию, и энергия рассеивается в виде тепла. В условиях солевого стресса ингибирование путей цитохромоксидазы или АО приводит к резким изменениям функциональности процессов окислительного дыхания митохондрий. Среди изменений, наблюдаемых в экспериментах, проведенных на листьях гороха, отмечается повышение концентрации АФК и как следствие резкое снижение устьичной проводимости, фотосинтеза и фотохимических реакций. Также наблюдалось увеличение скорости выделения CO₂ и электропроводности, что указывает на непосредственное воздействие на мембрану. На уровне экспрессии генов солевой стресс приводит к активации пути АО путем повышения уровня изоформ *PsAox1a* и *PsAox2*, а также уровня белка АО в тканях листьев *P. sativum* [36].

1.4 Роль транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов в условиях засоления

Как упоминалось ранее, одним из ключевых аспектов адаптивного ответа растений является регуляция экспрессии генов, которая позволяет активировать или ингибировать специфические гены, участвующие в процессе толерантности к стрессу, как биотическому, так и абиотическому. В случае солевого стресса, различные анализы транскриптома растений выявили взаимосвязь между сигнальными путями и другими стрессовыми стимулами, что приводит к изменению дифференциальной экспрессии многочисленных генов в зависимости от интенсивности и продолжительности стрессовой реакции [36]. В этом процессе важную роль играют такие белки, как факторы транскрипции (ТФ), ТФ действуют как молекулярные переключатели, которые контролируют активность генов и скорость транскрипции путем

связывания со специфическими последовательностями ДНК в промоторах генов. Таким образом, клеточная функция изменяется в различных тканях растений за счет синтеза специфических белков, улучшающих метаболическую адаптационную способность растений [105].

ТФ классифицируются на несколько семейств, каждое из которых имеет определённые функции и роли в регуляции генной экспрессии. В контексте засоления, факторы транскрипции, такие как WRKY, NAC, ERF/AP2, bZIP и другие, играют решающую роль в модуляции адаптивных ответов, особенно в регуляции генов, связанных с толерантностью к солевому стрессу [48, 16].

В растениях, ТФ WRKY представляют собой одно из крупнейших семейств ТФ. В своей структуре каждый ТФ WRKY содержит N-концевой ДНК-связывающий домен и C-концевой домен цинкового пальца. N-конец, известный как WRKY, состоит из 60 аминокислотных остатков, и его примечательной общей особенностью является гептапептидная последовательность WRKYGQK (Рис. 4) [52]. Структуры C-концевых цинковых пальцев разнообразны, в основном относятся к типу C₂H₂ и C₂H_С, однако они также существуют в форме C_X2₉H_XH и C_X7C_X24H_XC. Семейство WRKY подразделяется на 3 группы (группа I, II и III) в зависимости от количества доменов WRKY и типа структуры их мотивов «цинковых пальцев». Группа I содержит два домена WRKY и один C₂H₂, группа II — один домен WRKY и один C₂H₂, а группа III — один WRKY и один C_H2C [123].

ТФ WRKY специфически связываются с цис-элементами промоторной области, называемыми «W-боксами». Центральной последовательностью является TTGACC/T, которая позволяет им активировать или подавлять экспрессию определенных генов, содержащих эти последовательности в своей регуляторной области [136]. Исследования генов, кодирующих белки WRKY, у разных видов растений подтверждают их способность реагировать на абиотический стресс. У проростков пшеницы высокий уровень экспрессии генов WRKY наблюдался в начале холодового воздействия при 4°C [178].

Сверхэкспрессия *ZmWRKY114* в рисе снижает толерантность к солевому стрессу и чувствительность к абсцизовой кислоте, что приводит к снижению темпов роста и выживаемости [44]. Растения с мутацией *ZmWRKY33* демонстрировали повышенную устойчивость к солевому стрессу по сравнению с растениями дикого типа [119]. В *Zea mays* интенсивность экспрессии генов WRKY варьируется в листьях и корнях проростков в условиях солевого стресса [93].

Транскрипционные факторы семейства NAC (NAM, ATAF и CUC) [173] также являются важными генетическими регуляторами растений. На структурном уровне это семейство белков имеет схожие N-концевые структуры, которые характеризуются наличием пяти высококонсервативных субдоменов (A-E) (Рис. 4) и содержат около 160 аминокислотных остатков. Домен А облегчает образование функциональных димеров, домены В и Е способствуют функциональному разнообразию генов NAC, а субдомены С и D отвечают за связывание ДНК. С-конец белка NAC содержит область активации транскрипции [122].

Факторы NAC в ответ на абиотические стрессоры, такие как засоление, засуха и высокие температуры, действуют как ключевые регуляторы, повышающие стрессоустойчивость [164]. Полногеномное профилирование экспрессии и исследования транскриптома выявили ряд NAC TF, участвующих в реакциях на абиотический стресс. В корнях арабидопсиса 33 гена NAC значительно изменились у растений, инкубированных в NaCl [106], тогда как у риса 40 генов NAC реагировали на засуху и засоление [75]. Сверхэкспрессия гена *Vitis vinifera NAC17* у трансгенного арабидопсиса повышает толерантность к солевому, осмотическому и морозному стрессу, а также чувствительность к абсцизовой кислоте. Аналогично, GmNAC06 индуцирует накопление осмолитов, таких как пролин и глицин-бетаин, снижая воздействие активных форм кислорода и поддерживая гомеостаз ионов Na⁺ [121].

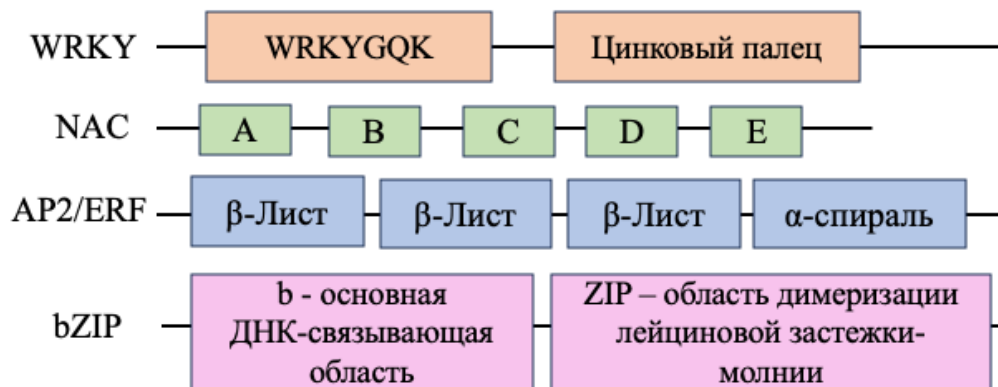


Рис 4. Консервативные структуры и домены транскрипционных факторов WRKY, NAC, AP2/ERF и bZIP [136]

Суперсемейство транскрипционных факторов AP2/ERF, также известное как AP2/EREBP, имеет ДНК-связывающий домен, состоящий примерно из 40–70 аминокислот, которые образуют три β-цепи и α-спираль (Рис. 4) [197]. Суперсемейство AP2/ERF состоит из четырех основных подсемейств на основе сходства последовательностей и количества доменов: AP2, RAV, DREB и ERF. Как факторы транскрипции, AP2/ERFs регулируют гены, участвующие в различных биологических процессах, включая рост, развитие, гормональные реакции и стресс, посредством транскрипционных и посттрансляционных механизмов [133]. За последние годы, в *Arabidopsis thaliana* было идентифицировано 122 гена, 139 генов — в *Oryza sativa L* [141], 322 гена — в геноме *Triticum aestivum* [155] и 229 генов — в *Zea mays* [53]. AP2/ERF также участвуют в реакциях абиотического стресса у растений. Например, *OsEREBP1* и *OsEREBP2* модулируют экспрессию *OsRMC*, негативного регулятора солевого стресса риса [163]. В кукурузе активность генов *ZmAP2-1*, *ZmDREB86*, *ZmDREB85*, *ZmERF82* и *ZmDREB80* высока после двухчасового солевого стресса [53].

Факторы транскрипции лейциновой молнии (bZIP) представляют собой одно из наиболее широко распространенных и консервативных семейств в царстве эукариот, обнаруженных в различных организмах, таких как растения,

животные и микроорганизмы [62]. Название этого семейства происходит от домена bZIP, состоящий из двух высококонсервативных доменов в последовательности от 60 до 80 аминокислот, расположенных в непрерывной α -спирали, позволяющей белкам bZIP связываться с ДНК (Рис. 4). Первый из этих доменов имеет последовательность N- \times 7-R/K, необходимую для локализации и специфического связывания с ДНК, тогда как второй соответствует области лейциновой застёжки, важной для формирования димерной структуры для связывания с ДНК. Помимо домена bZIP, эти ТФ содержат дополнительные мотивы, такие как сайт глутамина и сайт фосфорилирования, действующие как активаторы транскрипции [82]. У растений bZIP взаимодействуют с различными регуляторными элементами, такими как ABRE (CCACGTGG), PB (TGAAAA), GLM (GTGAGTCAT), G-box (CACG-TG), H-box (CCTACC) и ACE (ACGT) [82]. Факторы bZIP, благодаря своей высококонсервативной структуре и способности взаимодействовать с множеством регуляторных элементов, играют центральную роль в адаптации и выживании растений в условиях изменяющихся условий окружающей среды, таких как переохлаждение [17, 25], засуха [125, 198] и засоление [84, 202].

Глава II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение изменения биохимических и молекулярных аспектов функционирования фермента сукцинатдегидрогеназы и сукцинат-оксидазной системы в листьях растений C3 и C4 типа при кратковременном 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.

2.2 Объекты и методы исследования

2.2.1 Объекты исследования

Объектами исследования в данной работе являлись листья проростков *Zea mays L.* (сорт Воронежская 76) и *Triticum aestivum L.* (сорт Галина). На протяжении всего экспериментального процесса использовали листья 14-дневного роста обоих видов растений. Растения выращивали гидропонным способом в стандартных условиях при температуре 25°C и 12-часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м².

2.2.2 Экспериментальная постановка по моделированию солевого стресса

Моделирование стресса, вызванного хлоридом натрия, в листьях проростков *Zea mays* и *Triticum aestivum* проводили путем инкубации растений в 150 мМ растворе NaCl. Предварительно у проростков удаляли корневую систему, чтобы обеспечить быстрое поглощение ионов тканью листа. Общий инкубационный период составлял 24 часа при температуре 25°C со сменой солевого раствора каждые 6 часов, чтобы избежать колебаний концентрации растворенного вещества из-за испарения. Отбор образцов первой группы растений проводили перед инкубацией в растворе NaCl. В следующих группах были отобраны образцы после 6, 12 и 24 часов воздействия. Контрольные растения инкубировали в воде.

2.2.3 Определение активности сукцинатдегидрогеназы

Метод измерения активности сукцинатдегидрогеназы основан на быстром восстановлении 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) в системе, где присутствуют сукцинат и феназинметасульфат (ФМС) в качестве промежуточного переносчика электронов и скорость восстановления ДХФИФ

пропорциональна активности фермента [63]. Реакции проводили в конечном объеме 3 мл в среде, содержащей 30 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,8, 10 мМ сукцинат натрия, 0,08 мМ ДХФИФ, 2 мМ азид натрия в качестве ингибитора цитохромоксидазы и 20 мкл образца. Реакции инициировали добавлением ФМС до конечной концентрации 1 мМ. Снижение оптической плотности проводили на спектрофотометре Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 600 нм. За значение E принимали количество фермента, катализирующее 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25 °С.

2.2.4 Выделение митохондрий из растительного материала

Выделение митохондрий из листьев изученных растений осуществляли с помощью осмотического градиента на основе маннита по методу, предложенному *Millar A.H, et al* [138]. с некоторыми модификациями.

2.2.5 Определение активности сукцинатоксидазной системы

Оценку функционирования сукцинатоксидазной системы в процессе окислительного фосфорилирования проводили определения поглощения кислорода, зависящего от окисления сукцината в изолированных митохондриях полярографическим методом. Опыты проводили при стандартных условиях (25 °С и 101,32 кПа) с использованием электрода типа Кларка и системы Oxytherm (Hansatech Instruments Ltd., Pentney, UK). Митохондрии (50 мкл), выделенные из опытных растений, инкубированных на 150 мМ NaCl в течение 0, 6, 12 и 24 ч, и из контрольных растений добавляли в камеру со средой для измерения с последующим добавлением 5 мМ сукцината. После стабилизации поглощения кислорода (состояние 2) добавляли АДФ (конечная концентрация 100 нМ), что приводило к поглощению кислорода в состоянии 3 до тех пор, пока АДФ не истощался

(состояние 4). Ингибирование цитохром-с-оксидазы достигалось добавлением 1 мМ KCN [109]. Устойчивое к цианидам митохондриальное дыхание определяли как скорость поглощения кислорода после добавления KCN в качестве ингибитора [102]. Скорость окисления сукцината выражали в нмоль O_2 мин⁻¹ мг⁻¹ белка.

2.2.6 Определение количества белка

Общее количество белка, определяли по методу Лоури [152], основанному на образовании комплексов Cu^{+2} -пептидных связей, в которых Cu^{+2} восстанавливается до одновалентного иона в щелочных условиях. Cu^{+1} и радикальные группы тирозина, триптофана и цистеина реагируют с реактивом Фолина с образованием продукта, который восстанавливается до молибденового/вольфрамового синего.

2.2.7 Выделение и очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы

Данный метод экстракции и очистки изоферментов включает четыре стадии: первая - гомогенизация растительного материала; вторая - осаждение белков сульфатом аммония до насыщения 60%; третья - гель-фильтрация или гель-проникающая хроматография через колонку с сефадексом G25, в основном для удаления избыток сульфатных солей и других низкомолекулярных соединений; четвертый - ионообменную хроматографию с использованием ДЭАЭ-Sephacel, который представляет собой слабый анионит на основе гранулированной целлюлозы [15]. Элюирование происходило при скорости потока 1 мл/мин с использованием линейного градиента KCl. Для мониторинга фракций определяли активность сукцинатдегидрогеназы.

2.2.8 Электрофоретическое исследование сукцинатдегидрогеназы

2.2.8.1 Электрофоретический анализ

Состав и электрофоретическую подвижность изоформ СДГ определяли путем проведения электрофореза в полиакриламидном геле по Дэвису и Мауреру [60, 21]. Электрофоретическое разделение белков проводили в 0,05 М трис-глициновом буферном растворе, рН 8,3, при температуре 4°C и силе электрического тока от 1,5 до 2,5 мА.

2.2.8.2 Специфическое проявление изоферментов

Специфическое проявление сукцинатдегидрогеназы проводили в среде, содержащей 0,05 М трис-НСI-буфер, рН 7,4, 0,01 М ФМС, 0,01 М сукцинат натрия и 0,01 М нитросиний тетразолий хлорид. Инкубация геля осуществлялась в темноте при температуре 37°C.

2.2.8.3 Определение гомогенности ферментных препаратов

Гомогенность очищенных препаратов определяли методом универсального окрашивания белков в гелях нитратом серебра [167].

2.2.9 Исследование кинетических особенностей регуляции изоферментов

Для изучения кинетических и регуляторных свойств изоферментов сукцинатдегидрогеназы использовали очищенные и электрофоретические гомогенные препараты. Ферментативную активность каждой полученной изоформы определяли спектрофотометрически при различных концентрациях субстрата. Константы Михаэлиса и максимальные скорости рассчитывались с использованием графического метода обратных двойных величин Лайнуивера-Бёрка [127].

Определение оптимальных значений pH осуществлялось путем изучения зависимости скорости ферментативной реакции от различных значений pH.

2.2.10 Экстракция суммарной клеточной РНК и ДНК

2.2.10.1 Выделение суммарной РНК

Тотальную клеточную РНК выделили с использованием модифицированного протокола экстракции SDS-LiCl [185]. Растительный материал гомогенизировали в лизирующем растворе, содержащем 2% SDS, 2,5 М NaCl, 100 мМ Трис, 25 мМ ЭДТА и 1,5% β-меркаптоэтанола. Разделение органической и водной фаз осуществляли экстракцией фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом (25:24:1). Осаждение тотальной клеточной РНК проводили в три стадии с использованием различных концентраций LiCl и ацетата натрия. Обессоливание осадка проводили этанолом.

2.2.10.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК из растительного материала проводили путем гомогенизации в буфере, содержащем: 3% ЦТАБ (масс/об.), 1,4 М NaCl, 0,1 М трис-HCl, pH 8,0, 0,5 М ЭДТА и 0,3% 2-β-меркаптоэтанол [33]. Экстракцию осуществляли с использованием хлороформа:изоамилового спирта (24:1).

2.2.10.3 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Для анализа выделенных РНК и ДНК их разделение проводили методом электрофореза в агарозном геле [116] в буфере TAE с бромистым этидием EtBr в качестве интеркалирующего красителя («BioChemica PanReac Applichem», США). Для ДНК и РНК использовали 1% агарозный гель, для продуктов ПЦР — 2%. Документирование и анализ геля осуществляли через систему SERVA BlueCube 300 («SERVA», Германия).

2.2.11 Реакция обратной транскрипции

Синтез кДНК осуществляли с участием ревертазы на основе мРНК анализируемых образцов. Был использован набор ОТ-MMLV («Евроген», Москва, Россия) с «вырожденным» праймером, *random-праймер* согласно инструкции производителя.

2.2.12 Проведение ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 («Roche», Швеция). В качестве интеркалирующего красителя использовали SYBR Green I («Sigma Aldrich», США).

Амплификация (35 циклов) включала: денатурация – 95°C, 5 мин; отжиг праймеров, при 56-60°C – 20 с, детекция 72°C – 15 с; и элонгация в течение 10 минут при 72°C.

Фактор элонгации *Ef-1α* с ген-специфическими праймерами использовали в качестве количественного матричного контроля. Для отрицательного контроля использовали тотальную РНК. Оценку относительных уровней транскриптов проводили методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ [129].

Подбор праймеров проводили на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе данных GenBank, с помощью программы Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>).

- *TaSDH1* (LOC123102465): прямой 5'–CTGGGTACCCCTTCAGGAT–3', обратный 5'–CACGAGATGCCAGATCATTG–3', $T_{отжига}$ 57 С, Размер продуктов, 174 п.н.
- *TaSDH2* (LOC123156079): прямой 5'–TGTACGAGTGCATCCTCTGC–3', обратный 5'– TGGTATCCTCGAGCTTGGAC–3', $T_{отжига}$ 58 С, Размер продуктов, 217 п.н.

- *TaSDH3-2* (LOC123050789): прямой 5'-TTAGACGCTCCTCAGGCATT-3', обратный 5'-GAACGTAGCGCTCAAACCTGTG-3', T_{отжига} 58 С, Размер продуктов, 188 п.н.
- *TaSDH4* (LOC123063298): прямой 5'-AAAGACAGTTGCTGGGATGG-3', обратный 5'-GCTGATGCTGTTCTTCGACA-3', T_{отжига} 58 С, Размер продуктов, 220 п.н.
- *ZmSDH1-2* (LOC118472916): прямой 5'-TTGTGCAAACAGGGTAGCAG-3', обратный 5'-TGCATGTTGAGACGGATCTT-3', T_{отжига} 58 С, Размер продуктов, 150 п.н.
- *ZmSDH2-3* (LOC109944584): прямой 5'-GAGAGGCTACAGGCAATAACTGAG-3', обратный 5'-AGTTTTAAACATTGATTCTTATTG-3', T_{отжига} 58 С, Размер продуктов, 195 п.н.
- *ZmSDH3-1* (LOC100283351): прямой 5'-AAGGAGGCTTCTCCATCTCC-3', обратный 5'-CAGAGCTGCTACAGGGGAAG-3', T_{отжига} 59 С, Размер продуктов, 215 п.н.
- *ZmSDH4* (LOC100280324): прямой 5'-AACCCACTGGGAAGAGACCT-3', обратный 5'-GACGATTGACGCGAGAATTT-3', T_{отжига} 59 С, Размер продуктов, 187 п.н.
- *TaSDHAF1* (LOC123100313): прямой 5'-AGTTCCGTGAGAATGCCAAG-3', обратный 5'-ATGCTCGACACGTTGTTCTG-3', T_{отжига} 58 С, Размер продуктов, 170 п.н.
- *TaSDHAF2* (LOC123113731): прямой 5'-ACCCAGACTTGTGGAAATGG-3', обратный 5'-ATCCAGACCCCTTGTCTT-3', T_{отжига} 58 С, Размер продуктов, 191 п.н.

2.2.13 Бисульфитная модификация ДНК

Модификацию ДНК бисульфитом натрия проводили по схеме согласно ранее опубликованному протоколу с некоторыми изменениями [58]. Этапы включают: 1. Денатурацию ДНК; 2. Инкубация с бисульфитом натрия при повышенной температуре; 3. Удаление бисульфита путем обессоливания; 4. Десульфирование аддуктов сульфонилацила при щелочном pH; и 5. Удаление десульфорирующего раствора.

На первом этапе к 50 мкл образцов ДНК добавляли 5 мкл свежеприготовленной денатурирующей среды, содержащей 3 М NaOH и 0,5 М ЭДТА, pH 8,0. Образцы инкубировали при 55°C в течение 25 минут в темноте.

Дезаминирование проводили добавлением к образцам насыщенного раствора бисульфита натрия в присутствии гидрохинона, pH 5,0 и инкубировали при 55°C в течение 5 часов в темноте.

Обессоливание образцов бисульфит-модифицированной ДНК проводили в три стадии охлажденным этанолом концентраций 65%, 75% и 85% с использованием ацетата натрия в конечной концентрации 0,3 М. В каждой стадии образцы центрифугировали при 12000 об/мин - 10 мин.

Десульфирование модифицированных образцов ДНК проводили в щелочной среде добавлением NaOH до концентрации 0,3 М. Далее образцы инкубировали в течение 20 мин, при 37°C. Осаждение ДНК осуществляли добавлением 3 М CH₃COONa и двух объемов 85%-ного этанола.

2.2.14 Анализ промоторов генов и подбор праймеров для метил-специфичной ПЦР

Для идентификации CpG-островков использовались критерии, включающие участки ДНК длиной не менее 200 п.н., содержащие более 50% гуанина/цитозина и соотношение наблюдаемого и ожидаемого присутствия

CpG-динуклеотидов $> 0,6$ [120]. На основании данных критериев были проанализированы промоторные области генов СДГ. Подбор специфических праймеров для анализа CG-динуклеотидов осуществлялся с помощью онлайн-программы MethPrimer – LiLab (PUMCH).

2.2.15 Проведение метил-специфичной ПЦР

Оценку статуса метилирования изученных CpG-динуклеотидов в промоторах генов СДГ определяли с помощью метилспецифичной ПЦР и последующего электрофореза в 2% агарозном геле. МС-ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) с использованием программы ScreenMix (ОАО «Евроген», Москва). В качестве матрицы использовали ДНК, предварительно модифицированную бисульфитом. Численные значения статуса метилирования рассчитывали на основе анализа продуктов ПЦР. Исследуемые цитозины могут быть неметилированными, метилированными или частично метилированными, в соответствии с этим численный перевод проводят по Епринцеву с соавт. [67].

2.2.16 Анализ промоторной области генов на наличие сайтов связывания солевых факторов транскрипции

Биоинформатический анализ регуляторной области генов СДГ на наличие сайтов связывания транскрипционных факторов проводили с помощью базы данных растительных транскрипционных факторов PlantRegMap/PlantTFDB v5.0 (<https://planttfdb.gao-lab.org/>). Анализ результатов и их представление осуществляли с помощью программного обеспечения TBtools.

2.2.17 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку экспериментального материала проводили с помощью программы Jamovi v. 2.5.4 для MacOS. Программное обеспечение для анализа данных (программное обеспечение с открытым исходным кодом <https://www.jamovi.org> Сидней, Австралия). По каждому методу измерений проводили три повтора каждого из анализов. Дисперсионный анализ был проведен для определения достоверных различий средних значений полученных данных между группами из трех или четырех биологических повторов. Согласно этому критерию, данные представлены как средние значения с соответствующими стандартными отклонениями и уровнем значения $p < 0.05$.

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние солевого стресса на функционирование сукцинатдегидрогеназы

3.1.1 Влияние NaCl на активность фермента сукцинатдегидрогеназы в изолированных митохондриях

Воздействие хлорида натрия на ферментативную активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), было изучено в митохондриях, выделенных из 14-дневных листьев *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L.*, которые инкубировали в течение 5 мин при различных концентрациях NaCl от 0 до 300 мМ. При проведении анализа динамики каталитической активности СДГ в митохондриях, выделенных из листьев кукурузы, показано, что при концентрации NaCl от 50 до 150 мМ наблюдалось постепенное увеличение активности фермента, достигающая максимума при 150 мМ NaCl. Возрастание активности изучаемого фермента составило 35,48% по сравнению с контрольным вариантом. Однако, при 200 мМ NaCl этот показатель снизился лишь на 17,74%, а затем наблюдалось значительное угнетение активности СДГ (см Рис 5). Влияние NaCl на активность СДГ в митохондриях, выделенных из листьев пшеницы, также проявляло аналогичную тенденцию, с увеличением общей активности на 21,58% при 100 мМ NaCl по сравнению с митохондриями, инкубированными в растворе без NaCl. В диапазоне концентраций от 100 до 300 мМ активность СДГ резко снижалась, что привело к снижению на 59,37% по сравнению с контрольным образцом и на 66,73% относительно максимальной активности при 100 мМ NaCl (см Рис 5).

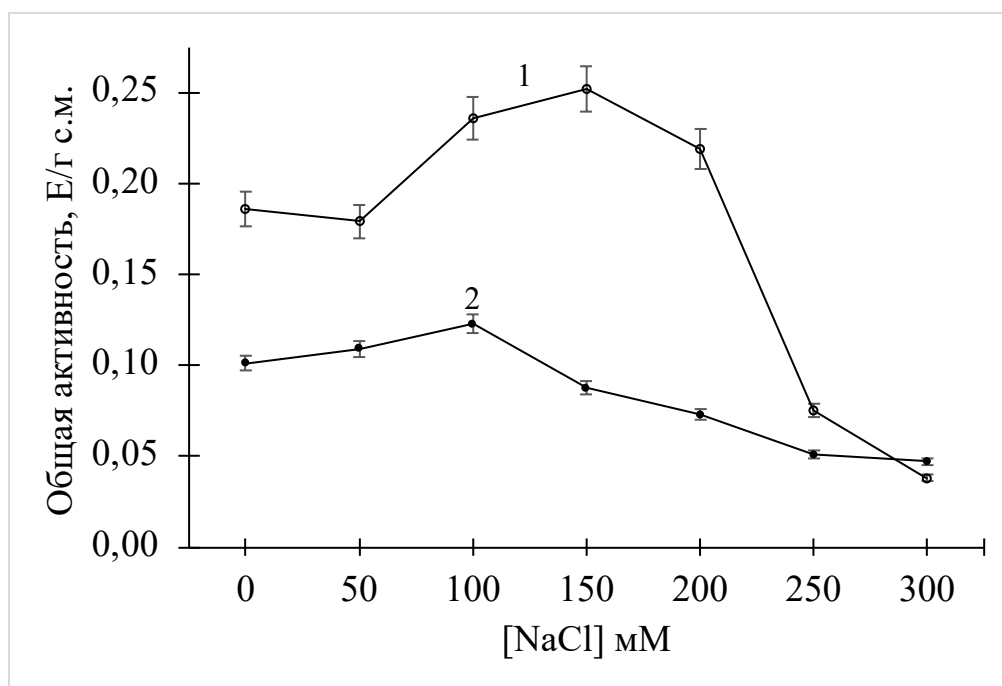


Рис. 5. Общая активность сукцинатдегидрогеназы в митохондриях листьев кукурузы (1) и пшеницы (2) при действии разных концентраций NaCl. Данные по активности представляют собой среднее значение трех биологических повторов \pm SD.

Небольшое повышение концентрации NaCl в реакционной среде, содержащей изолированные митохондрии, вызывало различное повышение ферментативной активности СДГ в зависимости от вида растения. Присутствие анионов Cl⁻ в определённых концентрациях может напрямую активировать каталитический центр фермента, находящийся в субъединице 1. Предполагается, что это происходит через механизм взаимодействия с аминокислотными остатками сайта связывания субстрата, аналогичный взаимодействию других органических анионов, что влияет на сродство субстрата к ферменту [109]. Скорость, с которой фермент реагирует на различные концентрации хлорида, может указывать на различия в структурной стабильности полипептидной цепи и организации каталитического центра СДГ у данных видов растений.

3.1.2 Очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы и изучение их кинетических характеристик

В рамках исследования была проведена многостадийная очистка энзима СДГ из 14-дневных зеленых листьев кукурузы и пшеницы, выращенных в условиях солевого стресса.

В результате проведенного метода очистки были получены высокоочищенные изоферменты СДГ как из образцов кукурузы, так и из пшеницы. Данный метод экстракции и очистки включает четыре стадии: первая - гомогенизация растительного материала; вторая - осаждение белков сульфатом аммония до насыщения 60%; третья - гель-фильтрация или гель-проникающая хроматография через колонку с сефадексом G25, в основном для удаления избыток сульфатных солей и других низкомолекулярных соединений; четвертый - ионообменную хроматографию с использованием ДЭАЭ-Sephacel, который представляет собой слабый анионит на основе гранулированной целлюлозы. Полученные изоферменты сукцинатдегидрогеназы, из листьев проростков *Zea mays* и *Triticum aestivum*, выращенных в стандартных условиях и в присутствии хлорида натрия, демонстрируют разную степень сорбции на колонке ДЭАЭ-Sephacel.

После проведения ионообменной хроматографии с использованием линейного градиента хлорида калия были выделены две изоформы СДГ из опытных и контрольных растений (Табл. 2).

Таблица 2

Результаты по выделению изоформ СДГ из листьев *Zea mays* при стандартных условиях ($n = 3, p < 0.05$) [15]

Стадия	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	31,420	0,425	0,014	100	1
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20-60%	5,689	0,312	0,055	73,41	4,05
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	3,756	0,285	0,076	67,06	5,61
Хроматография на ДЭАЭ- (Sephacel)	0,085	0,088	1,035	20,71	76,54
	0,074	0,081	1,095	19,06	80,92

Таблица 3

Результаты по выделению изоформ СДГ из листьев *Zea mays*, выращенной в условиях засоления ($n = 3, p < 0.05$) [15]

Стадия	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	41,256	0,625	0,015	100	1
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20-60%	22,654	0,396	0,017	63,36	1,15
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	16,856	0,294	0,017	47,04	1,15
Хроматография на ДЭАЭ- (Sephacel)	0,154	0,096	0,623	15,36	41,15
	0,095	0,104	1,095	16,64	72,26

Две изоформы СДГ выделены из листьев кукурузы при засолении (Табл. 3) [15].

Результаты ПААГ-электрофореза с помощью метода окрашивания белка AgNO_3 подтвердили однородность белковых препаратов изоферментов СДГ (рис. 6а).

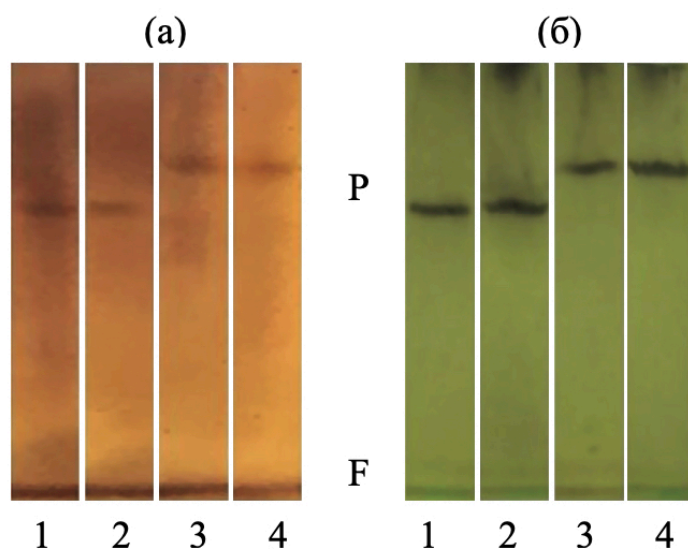


Рис. 6. Результаты электрофореза СДГ из листьев *Zea mays* (а) и специфическое проявление (б). 1 – изоформа 1 – H_2O , 2 – изоформа 1 - NaCl , 3 – изоформа 2 - H_2O , 4 – изоформа 2 - NaCl [15].

Специфическое окрашивание препаратов изоферментов, выделенных из контрольных растений и инкубированных в NaCl , показало две полосы для каждого изофермента, с электрофоретической подвижностью для СДГ1, составляющей 0,34, и две полосы для СДГ2 с подвижностью 0,23 (рис. 6б). [15].

Из листьев пшеницы, при проведении ионообменной хроматографии градиентом концентрации KCl от 30 до 240 мМ, были десорбированы две изоформы исследуемого фермента.

Максимальная величина удельной активности обнаружена для первой изоформы СДГ контрольных проб (Табл. 4). Ферментные препараты из листьев пшеницы, инкубированных в 150 мМ NaCl , десорбировались при концентрациях 69 мМ KCl для СДГ1 и 195 мМ KCl для СДГ2 (Табл. 5).

Таблица 4

Результаты по выделению изоформ СДГ из листьев *Triticum aestivum* при стандартных условиях ($n = 3, p < 0.05$)

Стадия	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	15,68	0,739	0,047	100	1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ 20-60%	7,53	0,411	0,055	55,67	1,16
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	3,38	0,297	0,088	40,19	1,86
Хроматография на ДЭАЭ- (Sephacel)	0,06	0,246	3,727	33,29	79,08
	0,09	0,285	2,969	38,57	62,99

Таблица 5

Результаты по выделению изоформ СДГ из листьев *Triticum aestivum*, выращенной в условиях засоления ($n = 3, p < 0.05$)

Стадия	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	13,97	0,647	0,046	100	1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ 20-60%	4,56	0,302	0,066	46,72	1,43
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	3,96	0,251	0,063	38,79	1,37
Хроматография на ДЭАЭ- (Sephacel)	0,082	0,204	2,488	31,53	53,74
	0,078	0,256	3,282	39,57	70,90

При проведении диск-электрофореза в ПААГ с использованием AgNO_3 в качестве универсального окрашивания на белок, наблюдали одну белковую полосу в анализированных образцах, полученных после очистки. С помощью специфического проявления тетразолием, была установлена сукцинатдегидрогеназная активность полученных ферментов из листьев пшеницы. Значения R_f составили 0,26 для СДГ1 контрольных и опытных образцов, для СДГ2 – 0,36 в обоих очищенных препаратах.

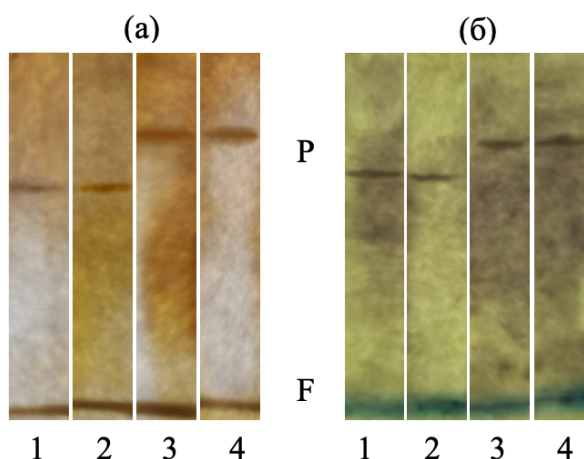


Рис. 7. Результаты электрофореза СДГ из листьев *Triticum aestivum* (а) и специфическое проявление (б). 1 – изоформа 1 – H_2O , 2 – изоформа 1 - NaCl , 3 – изоформа 2 - H_2O , 4 – изоформа 2 - NaCl

Как уже упоминалось, ДЭАЭ-Sephacel представляет собой слабый анионит с положительным зарядом. Одним из важных параметров, который необходимо было учитывать при ионообменной хроматографии, является изоэлектрическая точка (pI) — значение pH , при котором суммарный заряд молекулы фермента равен нулю. Согласно литературным данным, данная величина составляет 6,3 для субъединицы F_r (СДГ1) и 8,7 для субъединицы I_r (СДГ2) [160]. Следует отметить, что теоретические значения pI могут различаться у разных организмов, что в основном обусловлено аминокислотным составом, формирующим структуру этих изоферментов. При pH выше изоэлектрической точки белки обычно имеют суммарный отрицательный заряд и связываются с анионообменником [182].

Изоферменты, выделенные из контрольных и опытных образцов листьев *Zea mays* и *Triticum aestivum*, демонстрируют схожие профили элюирования по концентрации KCl, при которой они десорбируются из колонки с ДЭАЭ-Sephacel. Тем не менее, были отмечены определенные отличия в концентрациях десорбции, что может свидетельствовать о различиях в поверхностном заряде изоферментов, связанных с их структурной организацией. Данные различия также коррелируют с изменением их заряда в отрицательную сторону, что является результатом физиологических и биохимических изменений в растениях, таких как подщелачивание митохондриального матрикса вследствие увеличения синтеза АФК в условиях стресса [150].

3.1.2.1 Определение рН-оптимума изоферментов сукцинатдегидрогеназы

Были определены оптимальные значения рН для изоферментов сукцинатдегидрогеназы, выделенных из проростков кукурузы и пшеницы.

Исследование зависимости активности изофермента СДГ от рН показало, что между образцами, подвергнутыми солевому стрессу, и контрольными растениями по активности изоферменту СДГ1 из листьев кукурузы и пшеницы, не выявили существенные различия (см. рисунок 8 и 9).

Для СДГ1 из кукурузы, наибольшая активность энзима наблюдалась при рН 7.6 как в контроле, так и в опытных образцах. Для СДГ1, выделенной из листьев пшеницы, оптимальное значение рН составило 7,4 для обоих образцов. Величина рН-оптимума для СДГ2 из кукурузы составляла от 8.0 до 7.8 после действия засоления в течение 24 часов. Однако, величина оптимального рН СДГ2, очищенного из листьев пшеницы, по сравнению с СДГ2 из кукурузы, не изменился в обоих образцах, а общая максимальная активность находилась при рН 7,8.

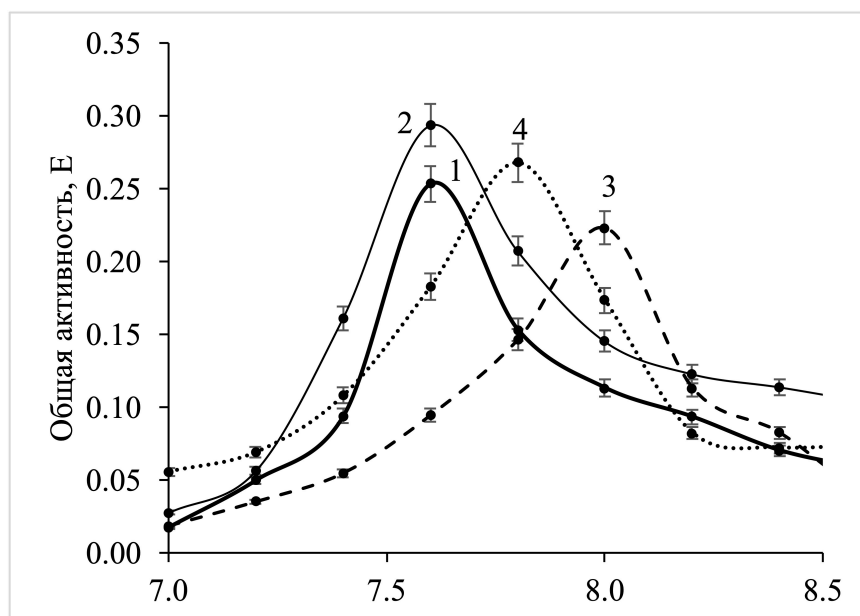


Рис. 8. Значение оптимального pH работы изоферментов СДГ из листьев *Zea mays* в разных условиях. 1 – изоформа 1 - К, 2 – изоформа 1 - NaCl, 3 – изоформа 2 - К, 4 – изоформа 2 - NaCl [15].

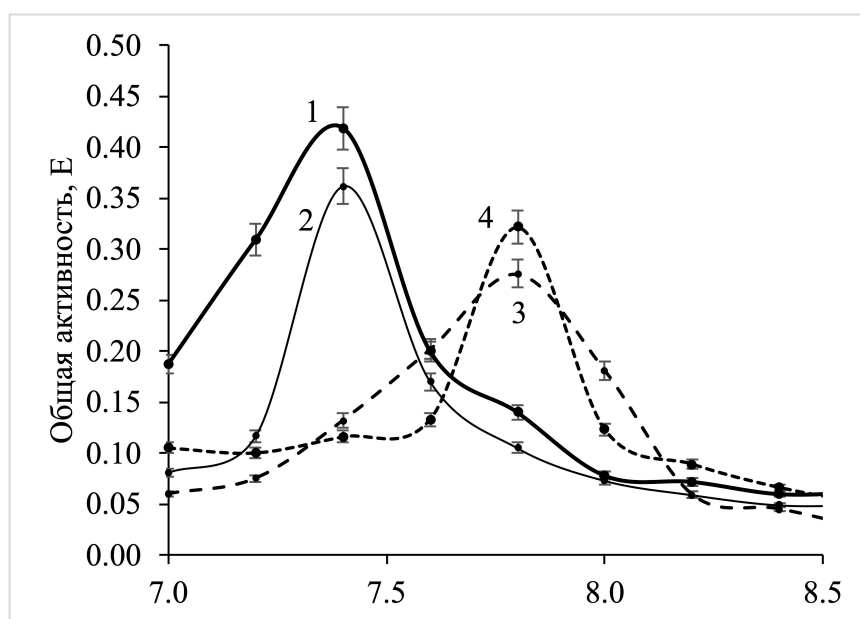


Рис. 9. Значение оптимального pH работы изоферментов СДГ из листьев *Triticum aestivum* в разных условиях. 1 – изоформа 1 - К, 2 – изоформа 1 - NaCl, 3 – изоформа 2 - К, 4 – изоформа 2 - NaCl

Важно отметить, что изменение значений рН митохондриального матрикса вызвано солевым стрессом, напрямую сказывается на скорости окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ [179].

3.1.2.2 Определение константы Михаэлиса-Ментен и V_{max} для полученных изоферментов СДГ

Для СДГ1 из кукурузы величина сродства к субстрату равнялась 1,08 мМ, что незначительно отличалось от K_M фермента, полученного из растений при засолении [15]. (табл. 6). С другой стороны, между значениями K_M , определенными для пшеницы СДГ1, наблюдалась другая тенденция по сравнению с изоформой СДГ1 из кукурузы. При этом величины K_M для анализируемого изофермента составили 1,02 и 1,17 для контрольного и опытного образцов, соответственно, что свидетельствует о существенном их различии.

Значения K_M для второго изофермента СДГ кукурузы в опыте составили 1,23, а в контроле - 1,18 мМ. Для СДГ2 из листьев пшеницы наблюдалось достоверное увеличение значений K_M . У растений, подвергшихся солевому стрессу, значение K_M составило 1,29, а в контроле – 1,23.

Значения K_M для изоферментов СДГ из листьев *Zea mays* и *Triticum aestivum* в контроле свидетельствуют, что СДГ2 имела меньшее сродство к субстрату. V_{max} для изоферментов СДГ из *Zea mays* как в контроле, так и в условиях засоления, изменялась для обеих форм фермента (табл. 6).

Соотношение V_{max}/K_M для СДГ1 и СДГ2 из контрольных растений были на 11,1% и 16,7% ниже, чем у этих изоферментов из растений при засолении [186]. Однако, для изоферментов листьев пшеницы наблюдалась дифференциальная тенденция. Зависимость максимальной скорости от константы Михаэлиса была в 0,83 раза выше для СДГ1 и в 1,73 раза ниже для СДГ2 в контрольных образцах по сравнению с опытными растениями.

Таблица 6.

Результаты определения K_m и V_{max} по сукцинату для изоферментов СДГ из листьев *Zea mays* [15] и *Triticum aestivum*.

СДГ Изофермент	K_m , мМ	V_{max} , мкмоль/мин	V_{max}/K_m
<i>Zea mays</i>			
СДГ1 Контроль	1.08 ± 0.03	0.174 ± 0.005	0.16
СДГ2 Контроль	1.18 ± 0.01	0.233 ± 0.002	0.20
СДГ1 24 ч NaCl [150 мМ]	1.13 ± 0.04	0.204 ± 0.008	0.18
СДГ2 24 ч NaCl [150 мМ]	1.23 ± 0.06	0.296 ± 0.015	0.24
<i>Triticum aestivum</i>			
СДГ1 Контроль	1.02 ± 0.02	0.302 ± 0.005	0.30
СДГ2 Контроль	1.23 ± 0.01	0.287 ± 0.002	0.23
СДГ1 24 ч NaCl [150 мМ]	1.17 ± 0.03	0.297 ± 0.011	0.25
СДГ2 24 ч NaCl [150 мМ]	1.29 ± 0.04	0.517 ± 0.017	0.40

3.1.3 Влияние солевого стресса на митохондриальное дыхание и активность сукцинатоксидазы

Исследование митохондриального дыхания, зависящего от окисления сукцината, проведено в условиях кратковременного солевого стресса. На рисунке 3 представлено увеличение активности сукцинат-оксидазной системы в митохондриях листьев проростков кукурузы и пшеницы, инкубированных в 150 мМ NaCl. В течение первых 6 часов воздействия NaCl не наблюдалось существенных изменений в сукцинат-оксидазной системе. Однако, через 12 часов отмечалось небольшое постепенное увеличение на 9,45% дыхательной активности митохондрий. В конце 24-часового периода эксперимента в условиях солевого стресса наблюдается значительное возрастание потребления кислорода в изолированных митохондриях листьев кукурузы, достигнув 68,77%, в то время как в контрольных образцах этот рост составил

24,28%, что привело к повышению дыхательной активности на 35,80% (Рис 10а).

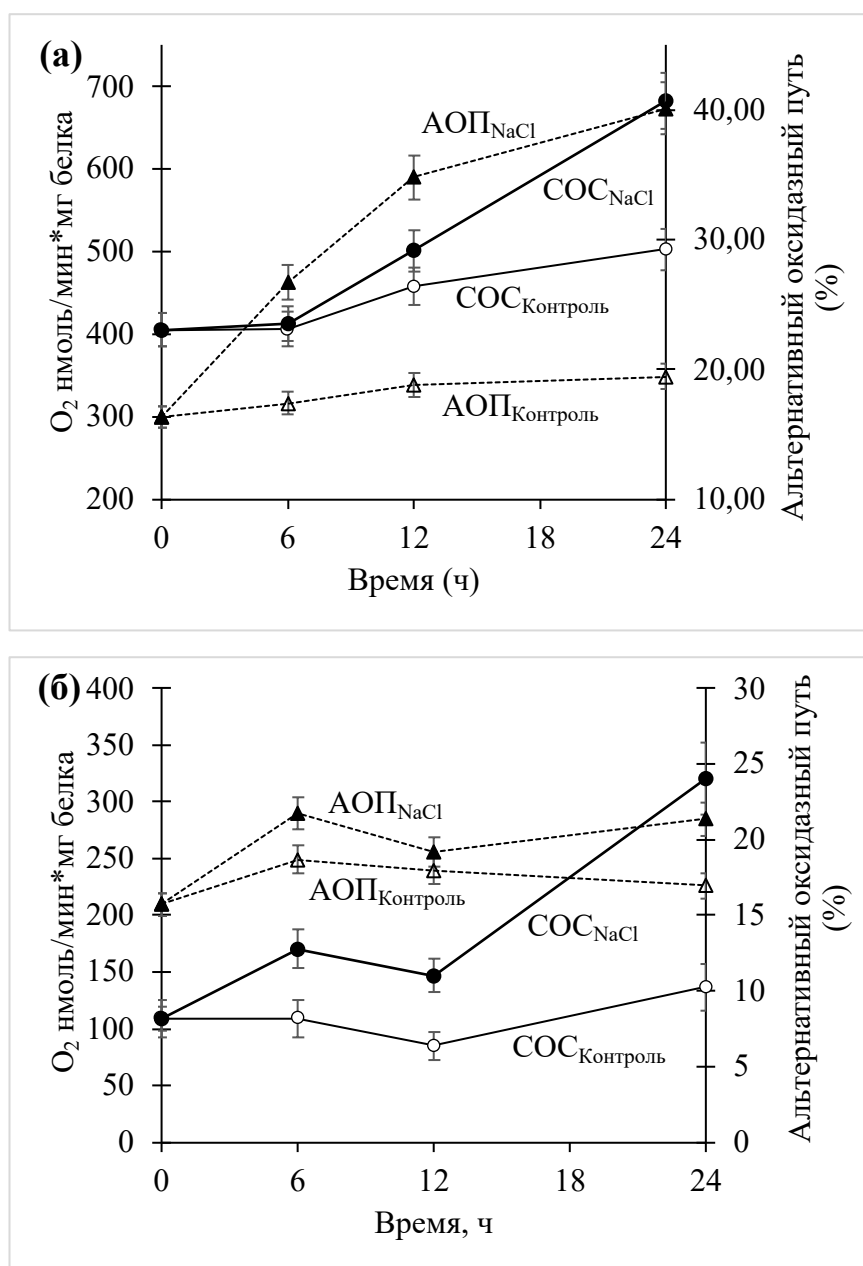


Рис. 10. Активность сукцинат-оксидазной системы (COС) и цианидрезистентное (альтернативный путь) участие в окислении сукцината в митохондриях, выделенных из листьев кукурузы (а) [76] и пшеницы (б) после инкубации проростков в 150 мМ NaCl. Данные по активности и цианидрезистентном окислении сукцината представляют собой среднее значение трех биологических повторов \pm SD.

В митохондриях листьев пшеницы, обнаружено, что сукцинат-зависимое дыхание митохондрий увеличивается на 55,9% в первые шесть часов по сравнению с образцами, инкубированными в воде. К 12-часовому периоду потребление кислорода медленно снижается на 13,5% относительно результатов, полученных после 6 часов инкубации. Максимальная активность сукцинат-оксидазной системы наблюдалась через 24 часа, возрастая в 2,34 раза по сравнению с контрольным образцом (Рис 106).

По результатам анализа данных исследования было выявлено, что солевой стресс оказывает различное воздействие на процессы окисления сукцината и митохондриального дыхания в листьях кукурузы и пшеницы.

Наблюдаемое увеличение скорости окисления сукцината может быть связано с увеличением потока электронов через электрон-транспортную цепь, вызванным изменениями электрохимического градиента, возникающими в результате прямой стимуляции NaCl активностью АТФ-синтазы [183].

Более высокие скорости потребления кислорода наблюдались в митохондриях пшеницы. В то время как в листьях проростков кукурузы данный показатель был ниже. Анализ этих различий на уровне митохондриального дыхания позволяет предположить, что адаптивная реакция у растений с метаболизмом С3-типа, в отличие от С4-растений, требует более высокой активности сукцинатаксидазной системы для обеспечения нормального функционирования митохондриальной дыхательной цепи в условиях солевого стресса.

Из результатов, полученных при использовании цианида калия в качестве ингибитора, обнаружено, что участие альтернативного оксидазного пути (АОП) существенно различается в митохондриях кукурузы и пшеницы. В присутствии ионов Na^+ и Cl^- , активность альтернативного оксидазного пути выше в митохондриях кукурузы и составляла 40,13%, в отличие от митохондрий пшеницы, у которых данный показатель составлял 21,34% после

24 часов воздействия, в то время как в нормальных условиях участие АОП составляли 19,47% и 16,94% для кукурузы и пшеницы соответственно.

Хотя поглощение кислорода является важным показателем функционирования митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования. В исследованиях влияния хлорида натрия на работу митохондрий, важно отметить роль альтернативной оксидазы в растениях [101]. В основном, эти белки потребляют кислород и могут конкурировать с другими ферментными комплексами, присутствующими в ЭТЦ, такими как цитохром С-оксидаза. Известно, что активность АОП не способствует созданию электрохимического градиента, необходимого для синтеза АТФ. Однако, повышение ее активности указывает на то, что часть адаптивного ответа растений на увеличение ионов Na^+ и Cl^- определяется образованием нефосфорилированной цепи переноса электронов [171].

Как упоминалось ранее, одним из основных последствий солевого стресса у растений является также окислительный/нитрозирующий стресс – продукт дисбаланса образования активных форм кислорода и азота, которые напрямую влияют на жизненно важные компоненты клеточного функционирования [108]. В этих условиях стимуляция активности АОП может быть также связана с необходимостью растений минимизировать синтезируемые при солевом стрессе АФК и АФА и, таким образом, играть важную роль в регуляции окислительного стресса [135].

3.1.4 Изменение активности сукцинатдегидрогеназы в условиях засоления *in vivo*

В рамках настоящей работы, было изучено влияние солевого стресса на функционирование сукцинатдегидрогеназы *in vivo*. Полученные результаты позволили установить, что данный вид абиотического стресса оказывает

стимулирующий эффект на каталитическую активность фермента СДГ у изучаемых видов растений.

В листьях кукурузы показатель общей активности исследуемого фермента остается стабильным в первые двенадцать часов инкубации в NaCl по сравнению с активностью контрольных образцов. В последующие 12 часов эксперимента наблюдалось значительное повышение ферментативной активности СДГ на 51,34%, что соответствует увеличению скорости окисления сукцината изолированными митохондриями, которое составило 35,8% (Рис 11).

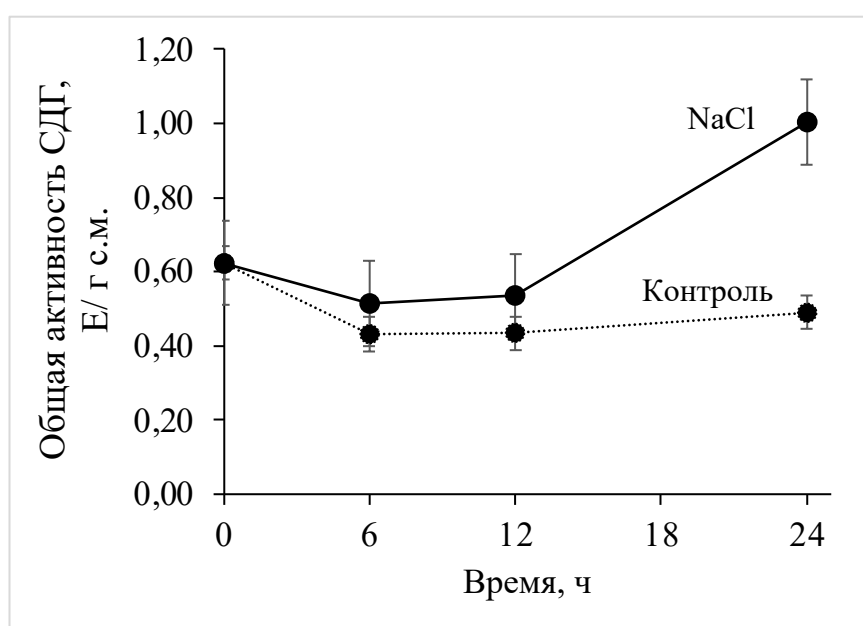


Рис. 11. Общая активности сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы при засолении. Данные по активности представляют собой среднее значение трех биологических повторов \pm SD.

Отличительной особенностью ответной реакции на солевой стресс в листьях пшеницы является более раннее изменение каталитической активности сукцинатдегидрогеназы. В первые шесть 6 часов засоления показано повышение анализируемого показателя на 68,9%, что согласуется с наблюдаемым увеличением поглощения кислорода в митохондриях. Во второй контрольной точке после 12 часов инкубации в NaCl не было отмечено

существенных изменений данного показателя. После 24 часов инкубации общая активность СДГ достигала ее максимума, с двукратным увеличением его активности по сравнению с проростками, инкубированными в воде (Рис 12).

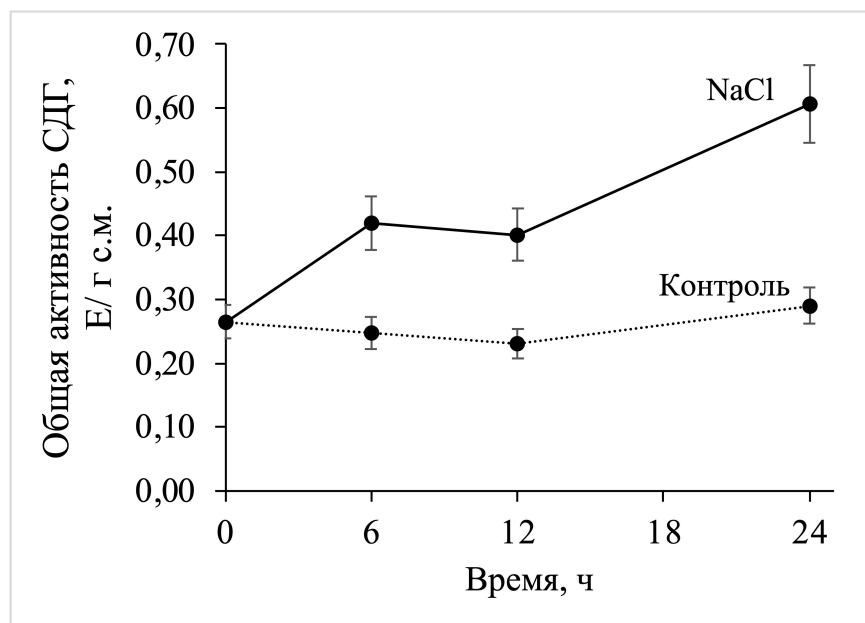


Рис. 12. Общая активность сукцинатдегидрогеназы в листьях пшеницы при засолении. Данные по активности представляют собой среднее значение трех биологических повторов \pm SD.

3.2 Влияние солевого стресса на регуляцию экспрессии генов СДГ

3.2.1 Изменение экспрессионной активности генов, кодирующих каталитический димер СДГ в *Zea mays* и *Triticum aestivum*

По результатам, полученным в данном исследовании, было установлено, что инкубация проростков *Zea mays* и *Triticum aestivum* в растворе NaCl с концентрацией 150 мМ приводит к увеличению скорости каталитической активности сукцинатдегидрогеназы и митохондриального дыхания в течение первых двадцати четырех часов стрессового воздействия. В связи с этим, важно выяснить механизмы, регулирующие активность данного фермента.

Учитывая, что сукцинатдегидрогеназа представляет собой фермент, состоящий из четырех субъединиц, участвующих в процессе окисления сукцината и обеспечивающих электроны для нормального функционирования окислительного фосфорилирования. Было проведено исследование динамики транскрипционной активности генов, кодирующих сукцинатдегидрогеназу.

При исследовании влияния солевого стресса на уровень транскриптов гена, кодирующего флавопротеиновую субъединицу 1 сукцинатдегидрогеназы, было выявлено, что данный показатель проявляет определенную тенденцию. У растений кукурузы в условиях солевого стресса происходит постепенное увеличение значения данного показателя 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 13).

Следовательно, наблюдаемое увеличение концентрации мРНК гена *ZmSDHI-2* согласуется с повышением общей активности СДГ в листьях кукурузы. Поскольку каталитический центр белкового комплекса содержится в первой субъединице, это может объяснить прямую связь между активностью этого гена и увеличением каталитической скорости фермента.

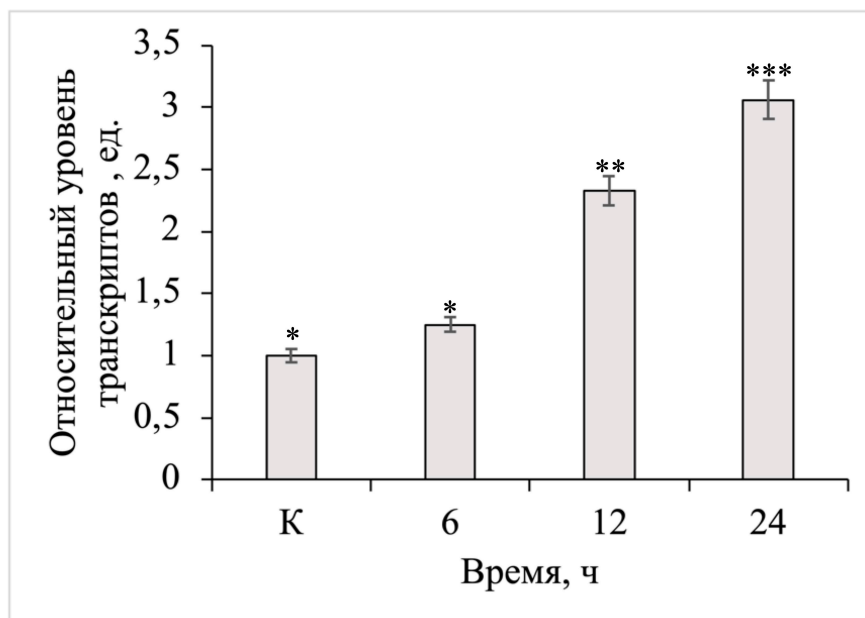


Рис.13. Уровень транскриптов гена *ZmSDHI-2* в листьях кукурузы при действии NaCl (150 мМ). К – контроль, растения, экспонируемые в воде [76].

Данная картина также соответствует динамике экспрессии гена *TaSDH1* пшеницы. Увеличение относительного уровня транскриптов данного гена проявлялось уже в первой точке экспериментального контроля при солевом стрессе (Рис 14).

В дальнейшем, содержание транскриптов гена *TaSDH1* снизилось, достигнув минимума к двенадцатому часу эксперимента и составив 3,84 единицы, но при этом оставаясь выше уровня, замеченного в контрольных образцах. К 24 часам инкубации растений пшеницы, транскрипционная активность *TaSDH1* значительно возросла, достигая максимума 8,27 ед. по сравнению с образцами, инкубированными в воде.

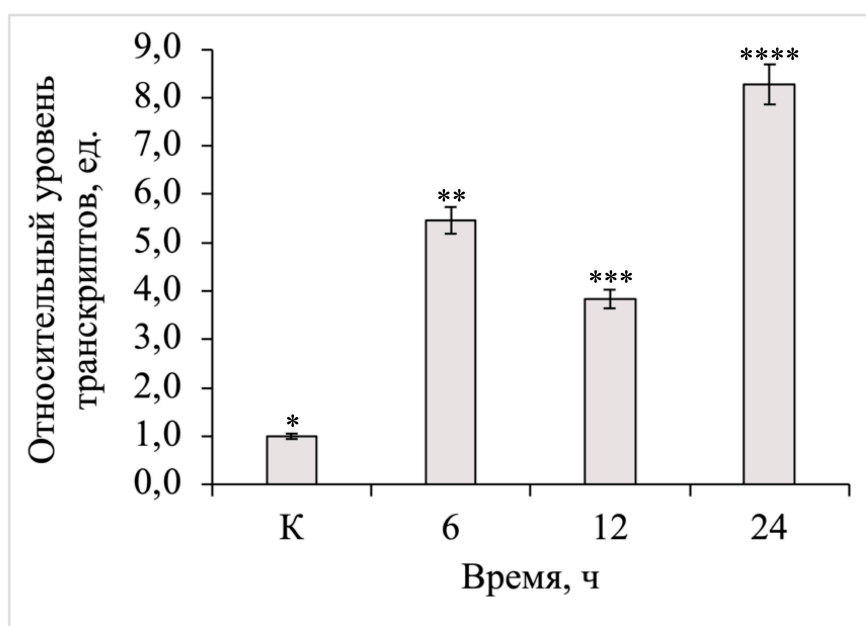


Рис.14. Уровень транскриптов гена *TaSDH1* в листьях пшеницы при действии (150 мМ). К – контроль, растения, экспонируемые в воде.

Хотя наблюдается общая тенденция к увеличению, между относительным уровнем экспрессии генов *ZmSDH1-2* и *TaSDH1*, на протяжении всего экспериментального периода существуют некоторые различия. 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*. Эти отмеченные различия указывают на более быструю активацию данного гена у пшеницы, по сравнению с геном *SDH1-2* у кукурузы. Эти отличия, вероятно, обусловлены разной чувствительностью к солевому стрессу и быстротой реакции в зависимости от типа растения и его метаболизма [166].

Стимуляция превращения сукцината в fumarат приводит к увеличению потока электронов через кластерную систему железо-сера, содержащуюся в субъединице 2.

Транскрипционная активность гена *ZmSDH2-3* железо-серной субъединицы СДГ при воздействии на кукурузу хлорида натрия соответствовала таковому показателю для 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 с увеличением на 2,53 единицы (Рис 15).

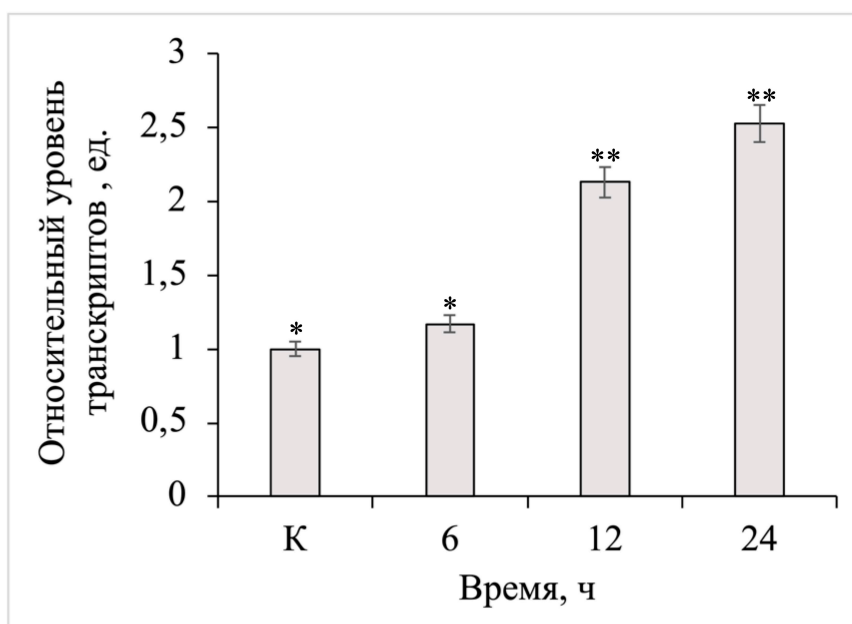


Рис.15. Уровень транскриптов гена *ZmSDH2-3* в листьях кукурузы при действии NaCl (150 мМ). К – контроль, растения, экспонируемые в воде [76].

На протяжении всего экспериментального периода обнаружено вариационное повышение активности гена *TaSDH2*, вызванное солевым стрессом (Рис. 16).

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 150 мМ 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.

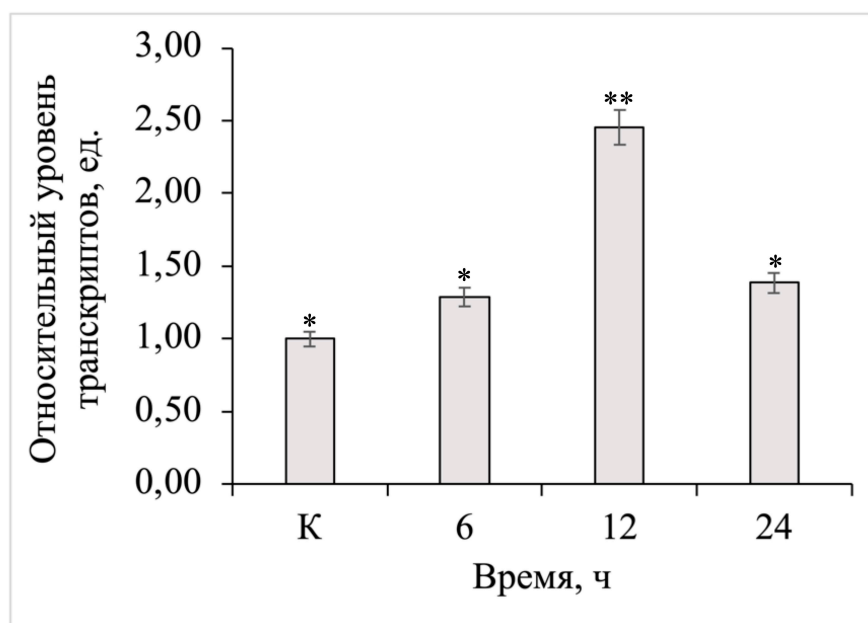


Рис.16. Уровень транскриптов гена *TaSDH2* в листьях пшеницы при действии NaCl. К – контроль, растения, экспонируемые в воде.

Для корректной интеграции субъединицы 2 в ферментный комплекс II необходимо участие молекулы SDHAF1. Фактор сборки SDHAF1 представляет собой митохондриальный белок, который содержит домен LYR, и его основной функцией является включение железо-серных кластеров в субъединицу СДГ2 [140]. Исследования, проведенные на мутантах арабидопсиса, показали, что блокирование гена *SDHAF1* приводит к значительному снижению как каталитической активности сукцинатдегидрогеназы, так и сукцинат-зависимого дыхания в изолированных митохондриях и, следовательно, вызывает избыточное накопление сукцината [124].

Поэтому, была проанализирована экспрессия гена *TaSDHAF1*, чтобы подтвердить стандартное функционирование субъединицы 2 в молекуле сукцинатдегидрогеназы.

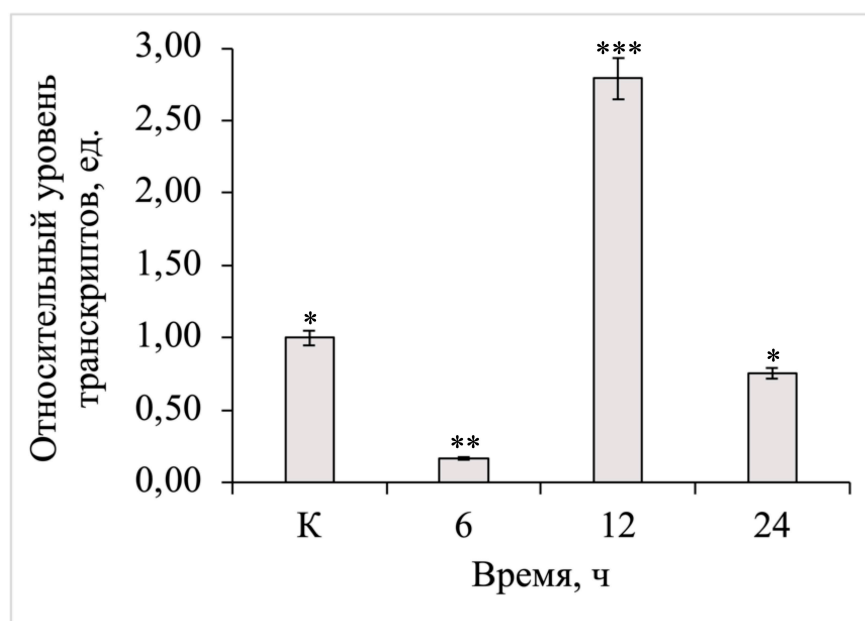


Рис.17. Относительный уровень транскриптов гена *TaSDHAF1* в листьях пшеницы при действии NaCl. К – контроль, растения, экспонируемые в воде.

Влияние солевого стресса оказывает четкое действие на экспрессию гена *TaSDHAF1*, кодирующий белок SDHAF1 (Рис.17).

Результаты показали аналогичную тенденцию по отношению к наблюдаемой в *TaSDH2*. Через 6 часов в экспериментальных образцах наблюдалось значительное ингибирование активности *TaSDHAF1* по сравнению с контрольными растениями. К 12 часам относительный уровень транскрипции увеличился 2,79 раза. После 24 часа инкубации в солевой среде, данный показатель снизился и достиг значений, близких к контролю.

Сравнительный анализ динамики изменения концентрации мРНК изучаемых генов, позволил установить, наличие корреляции с наблюдаемыми изменениями в экспрессии гена *TaSDH2*. Можно предположить, что важную роль в стабилизацию железно-серной субъединицы сукцинатдегидрогеназы играет фактор сборки SDHAF1, поскольку активность его гена, индуцируется увеличением концентрации ионов натрия и хлорида в растительной клетке и коррелирует с активностью *TaSDH2*. Таким образом, SDHAF1 обеспечивает нормальное функционирование транспорта электронов в СДГ2 в результате каталитического окисления сукцината под действием солевого стресса.

3.2.2 Влияние солевого стресса на изменение транскриптов генов мембраносвязанных субъединицы СДГ в листьях кукурузы и пшеницы

Результаты показали, что солевое воздействие хлорида натрия вызывает резкое повышение относительного уровня транскриптов гена *ZmSDH3-1* в первые шесть часов эксперимента. В последующие часы, было установлено значительное снижение экспрессии изучаемого гена (Рис 18).

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 концентрации мРНК наблюдались через 12 часов воздействия хлорида натрия, тогда как через 6 и 24 часа, генная активность *TaSDH3-2* отрицательно регулируется (Рис 19).

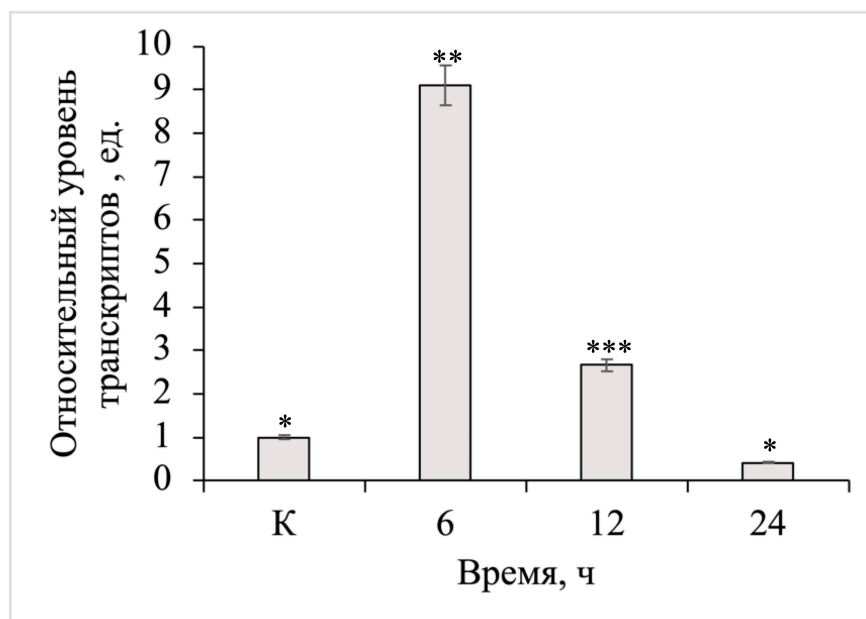


Рис.18. Относительный уровень транскриптов гена *ZmSDH3-1* в листьях кукурузы при действии NaCl (150 мМ). К – контроль, растения, экспонируемые в воде [76].

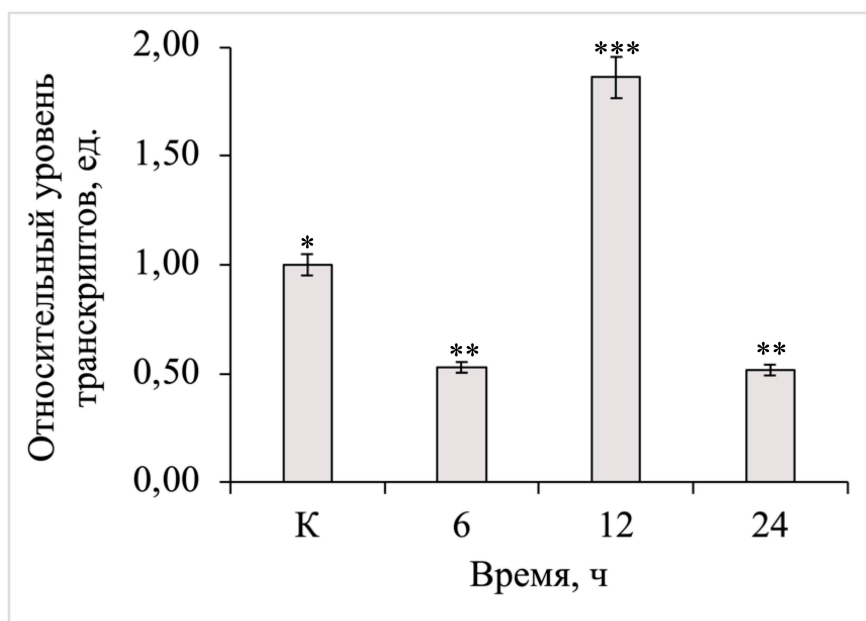


Рис.19. Относительный уровень транскриптов гена *TaSDH3-2* в листьях пшеницы при действии NaCl (150 мМ). К – контроль, растения, экспонируемые в воде.

Анализ результатов ПЦР-РВ при оценке содержания транскриптов гена *ZmSDH4*, в листьях *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L.*, при солевом стрессе,

свидетельствует о снижении его транскрипционной активности на протяжении всего периода воздействия хлорида натрия.

На протяжении всего экспериментального периода отмечалось значительное подавление интенсивности транскрипции данного гена у обеих растительных форм. К шестому часу экспозиции в NaCl уровень транскриптов *SDH4* снизился в 0,63 и 0,66 раза в листьях кукурузы (Рис 20) и пшеницы (Рис 21), 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 хлориде натрия, уровни мРНК в листьях обоих видов практически не наблюдали, подтверждая сильное ингибирование экспрессии гена. Эти результаты указывают на значительное воздействие солевого стресса на транскрипцию *SDH4* в листьях кукурузы и пшеницы.

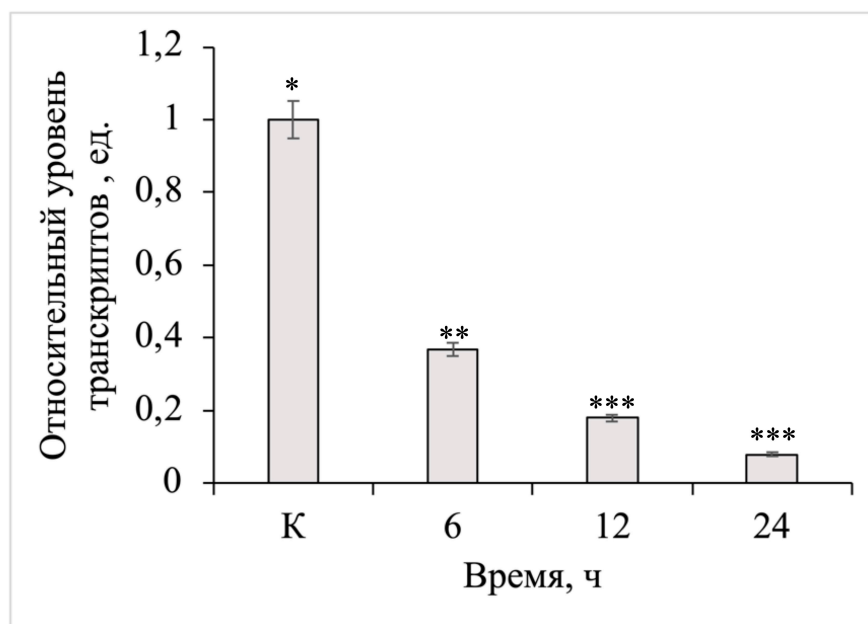


Рис.20. Относительный уровень транскриптов гена *ZmSDH4* в листьях кукурузы при действии NaCl (150 мМ). К – контроль, растения, экспонируемые в воде [76].

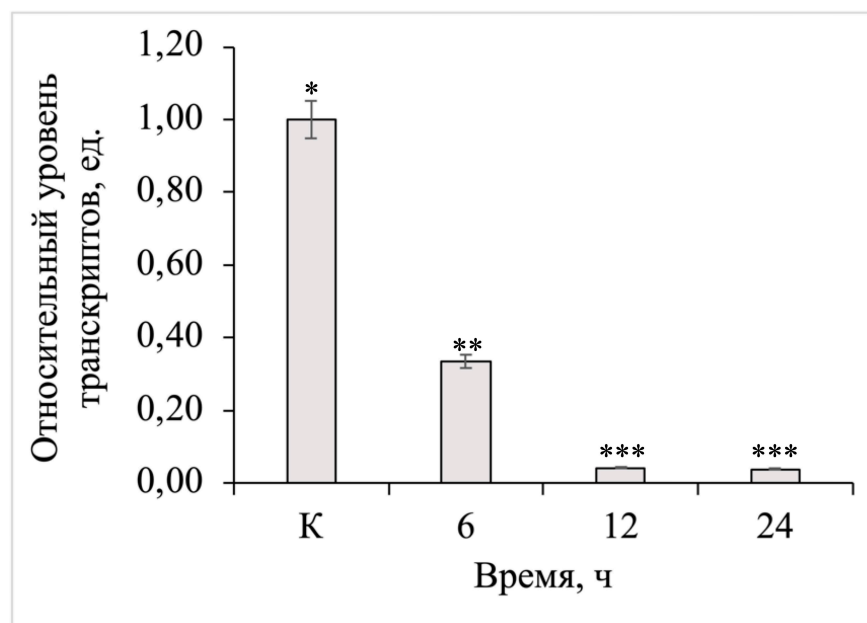


Рис.21. Относительный уровень транскриптов гена *TaSDH4* в листьях пшеницы при действии NaCl (150 мМ). К – контроль, растения, экспонируемые в воде.

Таким образом, было изучено воздействие солевого стресса на относительный уровень транскрипции генов, кодирующих субъединицы ферментного комплекса сукцинатдегидрогеназы, в листьях проростков кукурузы и пшеницы. Солевой стресс, как известно, влияет на обмен веществ и образование АТФ, а также на синтез белка, что считается ключевым для солеустойчивости [146].

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 NaCl на проростки исследуемых растений. Например, уровень транскриптов *SDH3* повышается, в то время как уровень *SDH4* снижается в листьях обоих видов растений в ответ на наличие хлорида натрия. Эти изменения, выявленные на уровне транскрипции изученных генов СДГ, свидетельствуют о том, что солевой стресс влияет на генетическую

экспрессию растений в определенной ткани и зависит от продолжительности воздействия [99].

Общий вывод данной работы подчеркивает, что гены, кодирующие гидрофильные субъединицы СДГ1 и СДГ2, имеют тенденцию к повышению активности, что, вероятно, обусловлено необходимостью формирования большего числа молекул СДГ для интенсификации окисления окисления сукцината, накапливаемого за счет высокой скорости функционирования ГАМК-шунта и поддержания митохондриального дыхания и синтеза АТФ на необходимом уровне [76].

3.3 Механизмы регуляции генетической активности генов

сукцинатдегидрогеназы при действии засоления

3.3.1 Распределение специфичных сайтов взаимодействия факторов транскрипции в нуклеотидной последовательности промоторов генов

сукцинатдегидрогеназы *Zea mays L* и *Triticum aestivum L*.

Исследование нуклеотидных последовательностей промоторов генов СДГ-системы *Zea mays* и *Triticum aestivum* с применением методов биоинформатики выявила наличие набора сайтов взаимодействия для стресс-зависимых факторов транскрипции, что позволяет предположить их роль в регуляции транскрипции данных генов.

Результаты биоинформатического анализа свидетельствуют о наличии в промоторной области генов СДГ *Zea mays* и *Triticum aestivum* cis-регуляторных элементов, характерных для факторов семейств bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2/ARF и ERF. Эти белки регулируют работу ряда генов, выступая в качестве трансдукторов биотического или абиотического стрессов [100].

На рисунке 22а представлено распределение общего количество сайтов связывания транскрипционных факторов, обнаруженных в промоторной области генов, кодирующих СДГ в кукурузе.

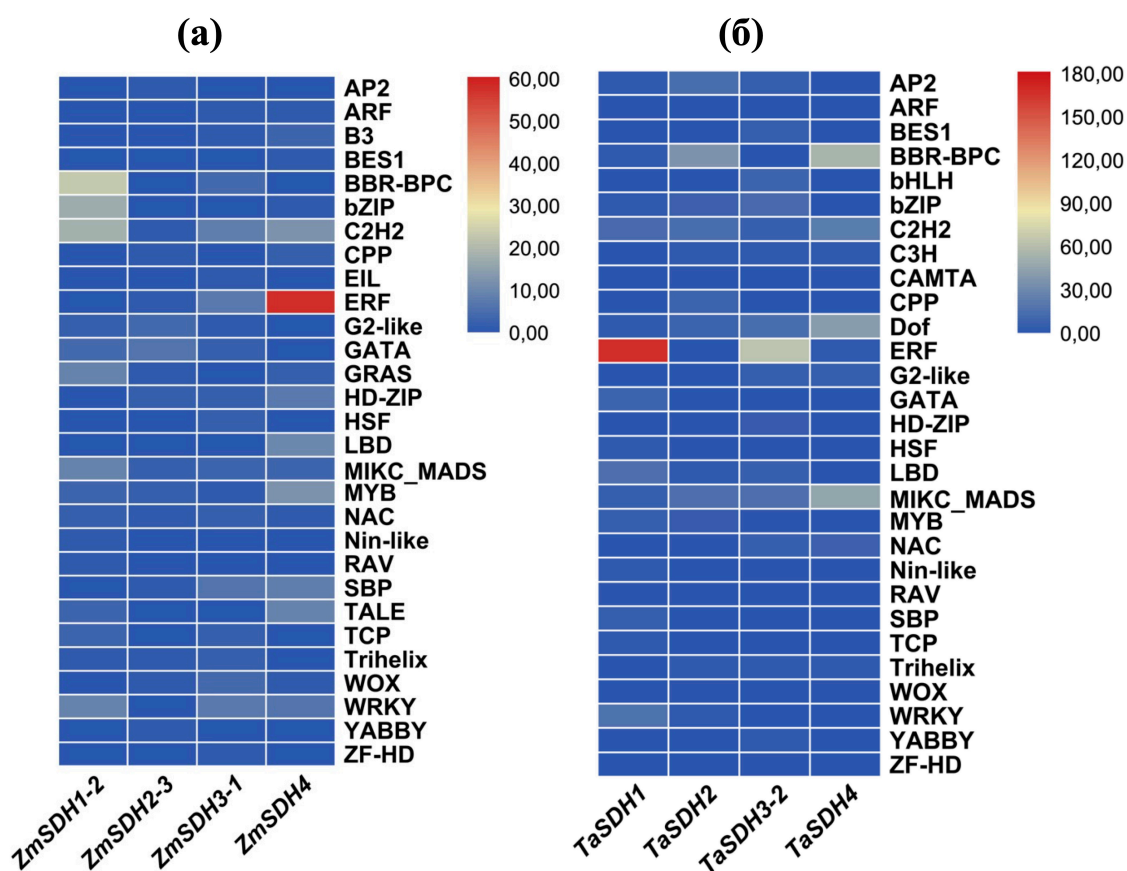


Рис.22. Общее количество сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторной области генов, кодирующих СДГ в *Zea mays* (а) и *Triticum aestivum* (б).

В промоторе *ZmSDH1* 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 регионе гена *ZmSDH2* 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 всего 57 сайтов связывания, 31,6% соответствуют ARF, C2H2, MYB, WRKY и NAC, причем сайты WRKY более

часто встречаются в регуляторной области [28]. 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 каждого из исследуемых генов СДГ-пшеницы (Рис 22б), показало, что общее количество сайтов связывания в промоторной области гена *TaSDH1* составило 252, из которых 80,9% представлены транскрипционными факторами, 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. Факторы транскрипции типа bZIP, C2H2, ERF, MYB, AP2 и NAC составляют 57,5% от общего количества 160 сайтов связывания в промоторной области гена *TaSDH3-2*. В регуляторной области гена *TaSDH4* данные факторы транскрипции составляют 29,3% от общего числа идентифицированных сайтов связывания.

Поскольку один и тот же сайт связывания может быть общим для различных факторов транскрипции, было оценено количество специфических факторов транскрипции из семейств bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2 и ERF, которые могут регулировать экспрессию генов, кодирующих компоненты фермента СДГ в условиях абиотического стресса.

Для гена *ZmSDH1* было обнаружено присутствие 35 факторов транскрипции из семейств bZIP, C2H2, WRKY, MYB и NAC. В промоторной области гена *ZmSDH2* выявлено наличие 6 различных транскрипционных факторов из семейств C2H2, ERF, MYB, NAC и AP2. Для *ZmSDH3-2* были определены 21 транскрипционный фактор, включающих ARF, C2H2, MYB, WRKY и NAC, в то время как в промоторной области *ZmSDH4* было обнаружено наибольшее количество транскрипционных факторов, в общей сложности 46, включающих ARF, bZIP, C2H2, ERF MYB, WRKY и NAC (Рис. 23а).

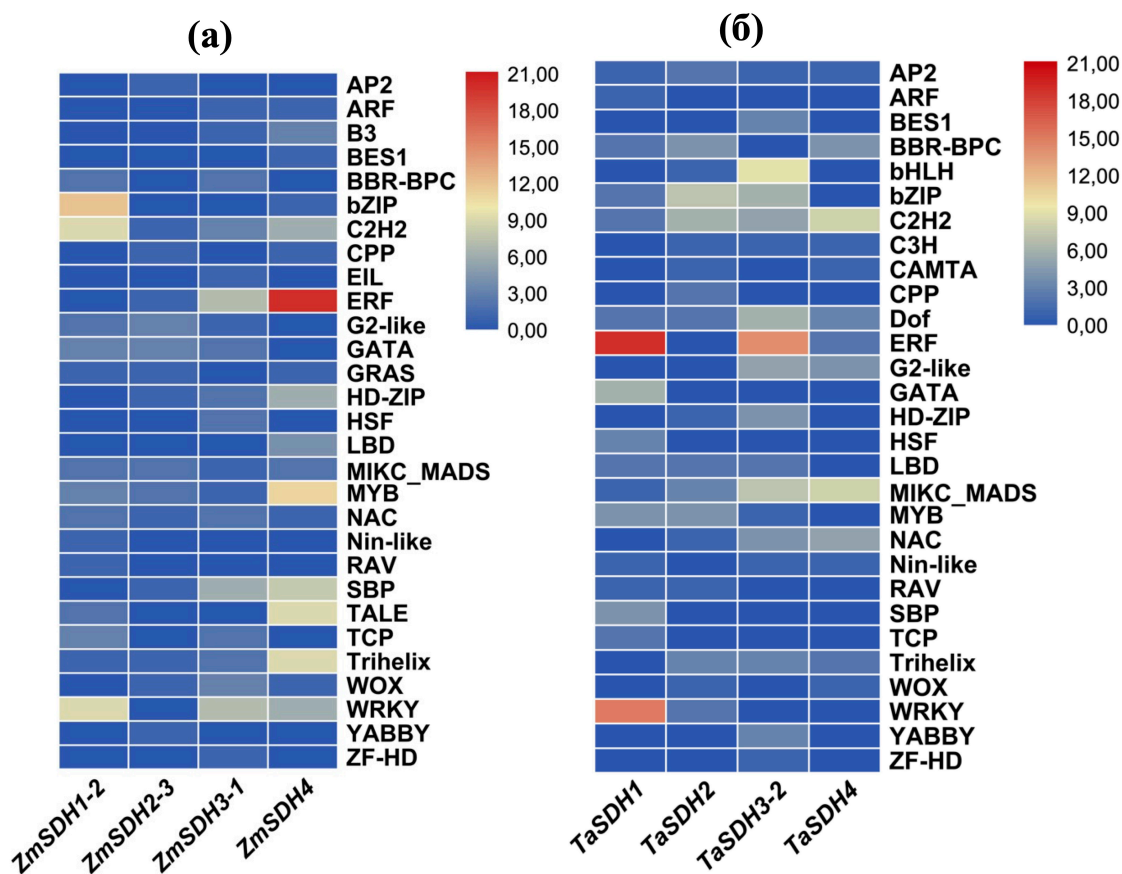


Рис.23. Общее количество специфических транскрипционных факторов, участвующих в регуляции генов, кодирующих СДГ в *Zea mays* (а) и *Triticum aestivum* (б).

В промоторной области гена *TaSDH1* факторы транскрипции AP2, ARF, bZIP, C2H2, WRKY, MYB и ERF составляют 64,7% от общего числа выявленных. В *TaSDH2* наиболее представлены транскрипционные факторы семейств AP2, bZIP, C2H2, WRKY, MYB и NAC, составляя 50%. В генах, кодирующих мембраносвязанные субъединицы СДГ, наблюдалось отсутствие WRKY, но более высокое присутствие NAC. В *TaSDH3-1* 40,8% соответствуют транскрипционным факторам AP2, bZIP, C2H2, ERF, MYB и NAC, а в *TaSDH4* 39% составляют только транскрипционные факторы AP2, C2H2, ERF и NAC (Рис. 23б).

Сравнительный анализ промоторных областей генов, кодирующих СДГ у кукурузы и пшеницы выявил возможность их взаимодействия с факторами транскрипции семейств WRKY и NAC. Стоит отметить разнонаправленный механизм регуляторного действия данных семейств факторов, при реализации ответной реакции на солевой стресс и регуляции экспрессии генов. 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 у обоих исследуемых организмов содержали большее количество сайтов связывания для факторов семейства NAC в составе своих промоторов, проявляющих ингибирующее действие на транскрипционную активность определенных генов, что находит своего отражение в понижении экспрессии генов мембраносвязанных субъединиц при воздействии солевого стресса.

3.3.2 Анализ промоторов генов сукцинатдегидрогеназы на наличие CG-островков

Для идентификации CpG-островков использовались критерии, включающие участки ДНК длиной не менее 200 п.н., содержащие более 50% гуанина/цитозина и соотношение наблюдаемого и ожидаемого присутствия CpG-динуклеотидов более 0,6 [120].

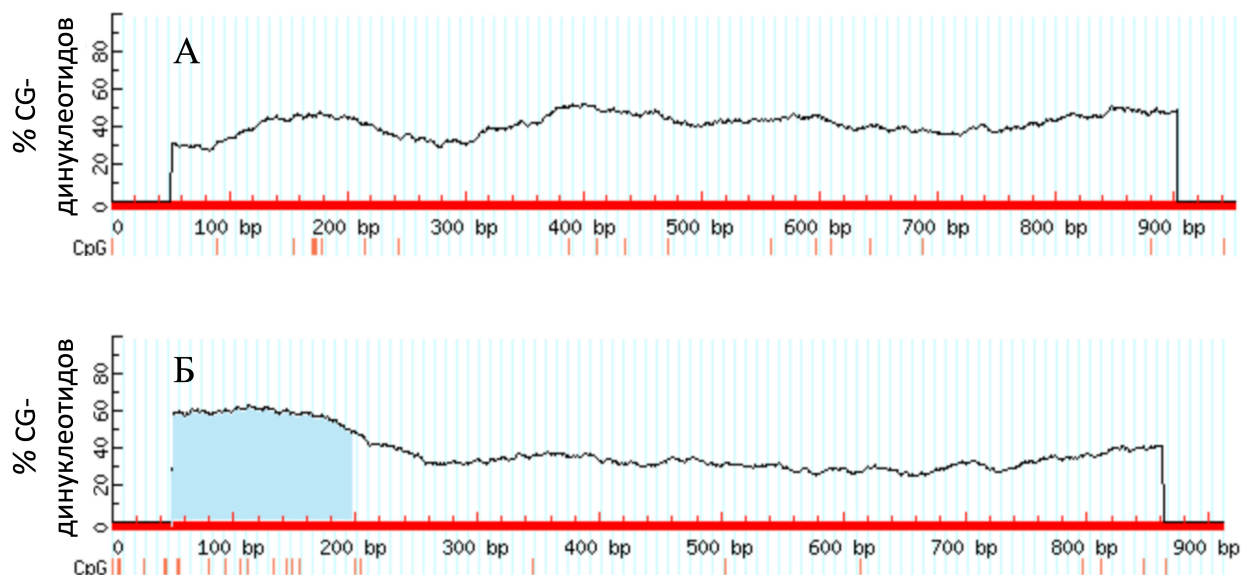


Рис.24. Анализ промоторной области генов *ZmSDH1-2* (А) и *ZmSDH2-3* (Б), кодирующих гидрофильный димер СДГ1-СДГ2 на наличие CpG-островков.

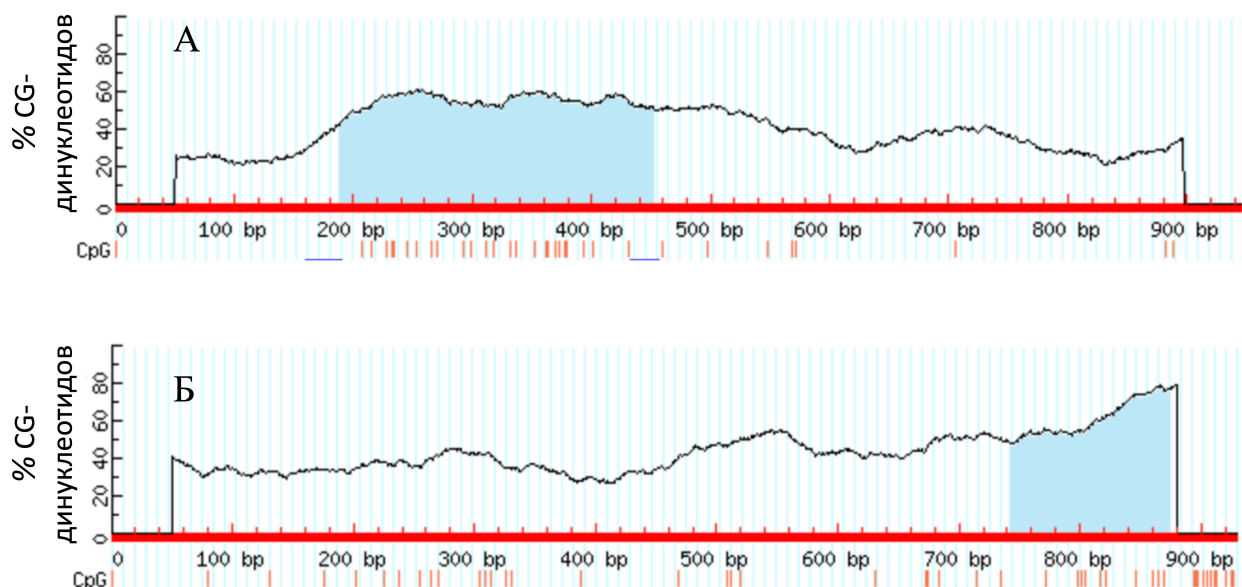


Рис.25. Анализ промоторной области генов *ZmSDH3-1* (А) и *ZmSDH4* (Б), кодирующих мембраносвязанные субъединицы СДГ3-СДГ4 на наличие CpG-островков.

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

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.

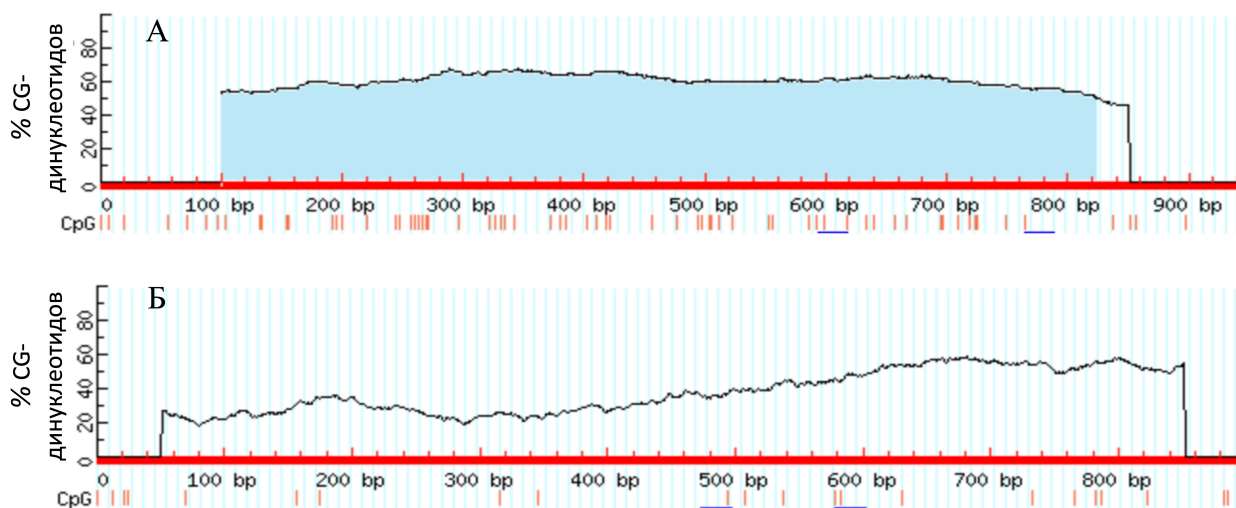


Рис.26. Анализ промоторной области генов *TaSDH1* (А) и *TaSDH2* (Б), кодирующих гидрофильный димер СДГ1-СДГ2 на наличие CpG-островков.

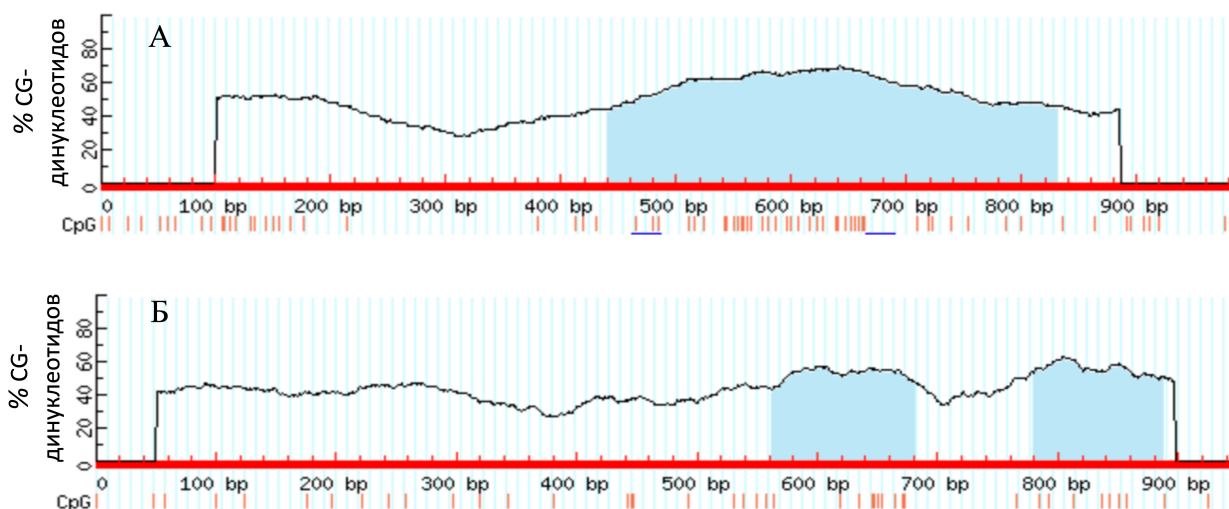


Рис.27. Анализ промоторной области генов *TaSDH3* (А) и *TaSDH4* (Б), кодирующих мембраносвязанные субъединицы СДГ3-СДГ4 на наличие CpG-островков.

3.3.3 Эпигенетические механизмы регуляции генов СДГ в листьях кукурузы, при воздействии хлорида натрия

Установлено, что для гена *ZmSDH1-2* характерно стабильное метильное состояние CG-динуклеотидов, сохраняющееся на уровне 50% на протяжении всего экспериментального периода в условиях солевого стресса. 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 интенсивности транскрипции 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 пропорциональна.

Таким образом, результаты данного исследования указывали на роль эпигенетической регуляции экспрессии генов, кодирующих различные субъединицы сукцинатдегидрогеназы. Наблюдаемые изменения варьировались в зависимости от изучаемых генов. В условиях солевого стресса метилирование промоторной области, по-видимому, не влиял 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 неактивную 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.

Полученные результаты согласуются с информацией предыдущих исследований о важности метилирования промоторов в регуляции генов, кодирующих различные ферменты, участвующие в цикле трикарбоновых

кислот в период прорастания [68], изменения светового режима [9], гипоксии [13] и засоления [7]. Ранее было показано, что изменение уровня метилирования промотора генов, кодирующих субъединицы СДГ, является механизмом их регуляции в условиях гипоксии [64] и при прорастании [67]. Если в условиях гипоксии это приводит к ингибированию активности СДГ и накоплению сукцината, то солевой стресс, напротив, вызывает активацию СДГ, обусловленную усилением экспрессии двух каталитических субъединиц. Эти исследования показали, что метилирование промотора является важным механизмом регуляции активности СДГ в условиях различных стрессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение высокоочищенных ферментных препаратов сукцинатдегидрогеназы из листьев проростков *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 обуславливает дифференциальную чувствительность к повышенному содержанию ионов натрия и хлорида в среде [109].

В растениях с метаболизмом С3 и С4-типа, солевой стресс индуцирует увеличение интенсивности функционирования цикла Кребса и окислительного фосфорилирования. Ферментативная активность СДГ *in vivo* повышалась при засолении, вероятно, во-первых, за счет ионизации каталитического центра фермента, вызванной Cl^- [109]; во-вторых, путем активации обходного пути ГАМК, который обеспечивает большой синтез сукцината. Кроме того, установленное возрастание скорости работы сукцинат–оксидазной системы свидетельствует об увеличении потока электронов через электрон-транспортную цепь вследствие изменения электрохимического градиента в результате непосредственной стимуляции хлоридом натрия активности АТФ–синтазы [171].

Полярнографический 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.

Анализ 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 [10], изменения светового режима [9], гипоксии [13] и засоления [7]. Ранее было показано, что изменение уровня метилирования промотора генов, кодирующих субъединицы СДГ, представляет собой механизм их регуляции в условиях гипоксии [64] и при прорастании [67]. 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. 28)

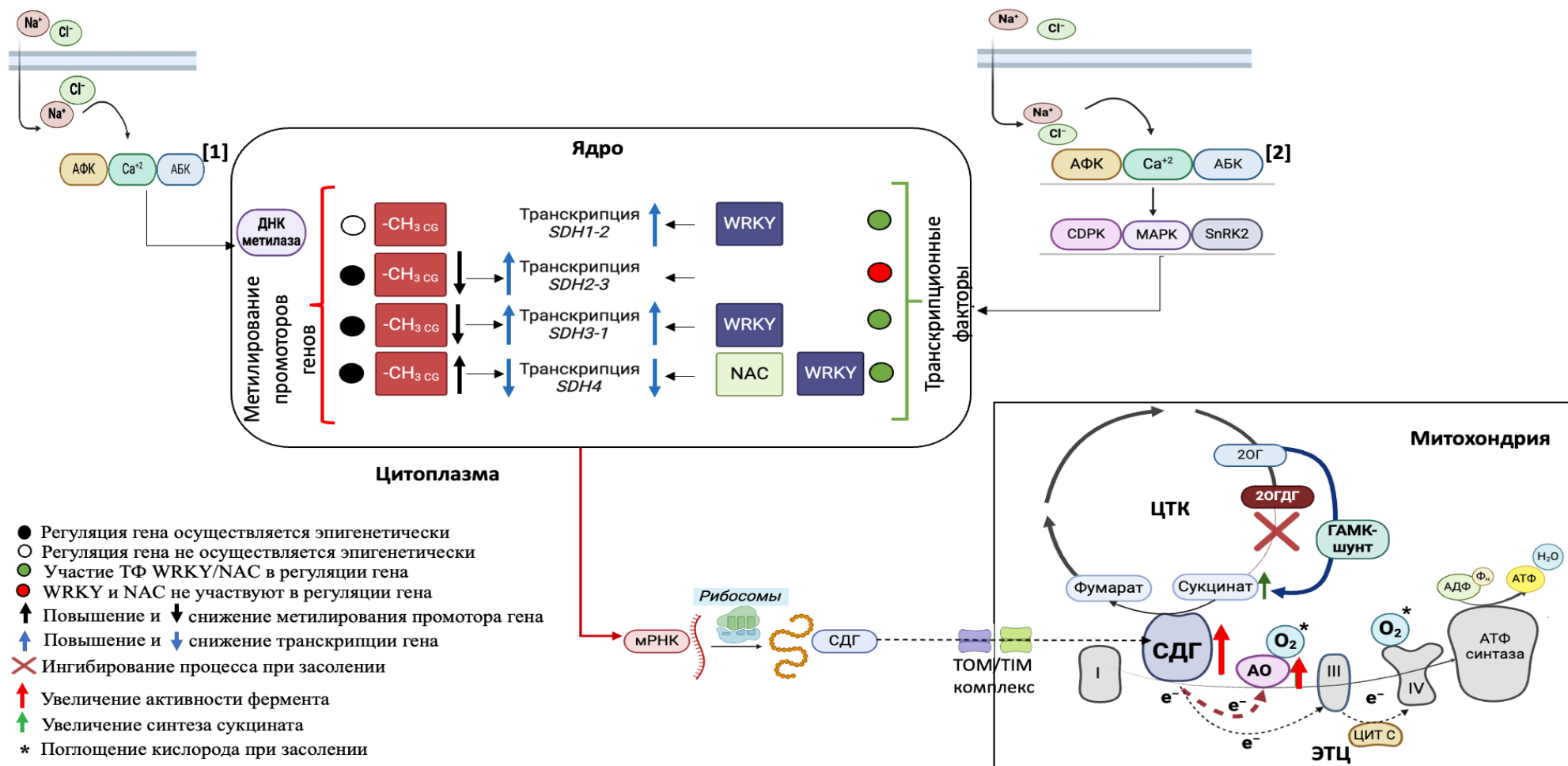


Рис. 28. Гипотетическая схема функционирования сукцинатдегидрогеназы в митохондриях листьев кукурузы и регуляция его активности в условиях кратковременного солевого стресса. Условные обозначения: СДГ – сукцинатдегидрогеназа, мРНК – суммарная матричная РНК, АБК – абсцизовая кислота, ТФ – транскрипционный 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 рН. 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 необходимая 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 солевых зависимых

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 CpG-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохина Г.Б. et al. Влияние солевого стресса на функционирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса кукурузы (*Zea mays* L.) // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. –2019. –№. 3. –С. 26-33.
2. Бычкова О. В. et al. Реакция генотипов яровой твердой пшеницы в условиях моделированного осмотического и солевого стресса // Вестник АГАУ. – 2018. – №2 – С. 160.
3. Гималов Ф. Р. et al. Изменение степени метилирования ДНК промоторной области СВF-гена капусты *Brassica oleracea* L. при холодной акклимации // Вестник Башкирского университета. – 2012. – Т. 17. –№ 1. – С. 82-85.
4. Гималов Ф. Р. et al. Степень метилирования ДНК промоторной области СВF-гена цветной капусты *Brassica oleracea* L. при различных температурных условиях выращивания // Вестник Башкирского университета. – 2012. – Т. 17. –№ 4. – С. 1749-1752.
5. Гималов, Ф. Р. Метилирование ДНК растений в связи с устойчивостью к стрессовым факторам среды // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – № 4. – С. 89-94.
6. Епринцев А. Т, Анохина Г. Б. Роль метилирования промоторов генов глутаматдегидрогеназы (GDH1 И GDH2) в регуляции их экспрессии в листьях кукурузы при гипоксии // Физиология растений. – 2023. – Т. 70. –№ 2. – С. 192-201.
7. Епринцев А. Т., Гатауллина М. О. Регуляция активности декарбоксилирующих малатдегидрогеназ в листьях кукурузы при адаптивной реакции на солевой стресс // Известия РАН. Серия биологическая. – 2023. – № 1. – С. 43-51.
8. Епринцев А. Т., Федорин Д. Н. Выделение в гомогенном состоянии конститутивных изоферментов сукцинатдегидрогеназы из щитков кукурузы и исследование их характеристик // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 2. – С. 141-146

9. Епринцев А. Т., Федорин Д. Н., Добычина М. Роль метилирования CpG-островков промотора гена *csu3* в световой регуляции активности АТФ-цитратлиазы в листьях кукурузы // Физиология растений. – 2019. – Т. 66. – С. 121-127.
10. Епринцев А. Т., Федорин Д.Н., Флорес Каро О. Эпигенетический механизм регуляции экспрессии генов мембраносвязанной субъединицы С сукцинатдегидрогеназы в прорастающих семенах кукурузы // Физиология растений. – 2022. – Т. 69. – С. 142-148.
11. Епринцев А.Т. Сукцинатдегидрогеназа высших растений / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов, Д. Н. Федорин // Воронеж: Центр. Черн. Книжное изд-во, – 2010. – 184 с.
12. Епринцев А.Т. et al. Получение гомогенных препаратов изоформ сукцинатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – С. 541–545.
13. Епринцев А.Т. et al. Роль эпигенетических механизмов в регуляции активности 2-ОГДГ и МДГ в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при гипоксии // Физиология растений. – 2021. – Т. 68. – С. 187-193.
14. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Федорина О.С. Особенности функционирования сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в листьях шпината *Chenopodium foliosum* l. и амаранта *Amaranthus caudatus* L. при солевом стрессе // Известия РАН. Серия биологическая. – 2021. – № 1. – С. 65-72.
15. 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.
16. Заикина Е. А. et al. Гены транскрипционных факторов, задействованных в ответе растений на абиотические стрессовые факторы // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 3. – С. 47-58.
17. Заикина Е. А. et al. Изменение активности генов транскрипционных факторов TANAC69, TADREB1, TABZIP60 у растений мягкой пшеницы при водном

- дефиците и гипотермии // Физиология растений. – 2022. – Т. 69. – № 3. – С. 327-336.
- 18.Иванищев В. В. О механизмах солеустойчивости растений и специфике влияния засоления // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2019. –№ 4. – С. 76-88.
- 19.Кондратьев М.Н., Роньжина Е.С., Ларикова Ю.С. Влияние абиотических стрессов на метаболизм вторичных соединений в растениях // Известия КГТУ. – 2018. – №49. – С. 203-219.
- 20.Кутлыева Л. Р. et al. Роль модификации гистонов и метилирования днк в развитии почечно-клеточных карцином // Экологическая генетика. – 2012. – Т. 10. – № 3. – С. 59–76.
- 21.Маурер Г. Диск-электрофорез: Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле: Пер. с нем. – Мир, 1971.
- 22.Медведев С. С., Шарова Е. И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов (обзор) // Журнал СФУ. Биология. – 2010. – Т. 3. – №2. – С. 109-129.
- 23.Пендина А. А. et al. Метилирование ДНК - универсальный механизм регуляции активности генов. // Экологическая генетика. – 2004. – Т. 2. – №1. – С. 27-37.
- 24.Рахманкулова З.Ф. et al. Сравнительное изучение устойчивости C_3 И C_4 ксеро-галофитов рода *atriplex* в условиях водного дефицита и засоления // Физиология растений. – 2019. – Т. 66. –№ 2. – С. 112-120.
- 25.Самарина Л. С. et al. Генетические механизмы акклиматизации чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) к холодному стрессу // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – № 8. – С. 958-963.
- 26.Федорева Л.И. Влияние солевого стресса на экспрессию генов K^+/Na^+ -транспортеров НКТ и ферментов SOD и Nfn у пшеницы // Теоретическая и прикладная экология. – 2019. – № 4 – С. 123-129.

27. Федорин Д. Н., Епринцев А. Т. Метилирование днк как способ регуляции экспрессии генов // Вестник ВГУ. Серия: химия. биология. фармация. – 2022. – № 2. – С. 44–51.
28. Флорес, К. О. Х. Идентификация сайтов связывания факторов транскрипции в промоторной области генов сукцинатдегидрогеназы у растений / К. О. Х. Флорес // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. Том Выпуск 25. – Воронеж: Центрально-Черноземное книжное издательство, 2023. – С. 180-184.
29. Хозеева Е. В., Зимина Ю. А., Срослова Г. А. Окислительный стресс растений: химия, физиология, способы защиты // Природные системы и ресурсы. – 2020. – Т. 10. – № 4. – С. 30–43.
30. Черкасских М. В., Епринцев А. Т. Особенности внутриклеточного распределения аконитазной активности в листьях пшеницы в стрессовых условиях // ВЕСТНИК ВГУ. – 2021. – № 2. – С. 43-49.
31. AbdElgawad H. et al. High Salinity Induces Different Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Maize Seedlings Organs // Front Plant Sci. – 2016. – Т. 7. – С. 276.
32. Abdulraheem MI. et al. Mechanisms of Plant Epigenetic Regulation in Response to Plant Stress: Recent Discoveries and Implications // Plants (Basel). – 2024. – Т. 13. – № 2. – С. 163.
33. Aboul-Maaty N. A. F., Oraby H. A. S. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method // Bull Natl Res Cent. – 2019. – Т. 43. – С. 25.
34. Acin-Perez R. et al. ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use // Cell Metab. – 2014. – № 19. – С. 1020-1033.
35. Affourtit C. et al. New insights into the regulation of plant succinate dehydrogenase. On the role of the protonmotive force // The Journal of biological chemistry. – 2001. – Т. 276. – № 35. – С. 32567–32574.

36. Analin B. et al. Cytochrome oxidase and alternative oxidase pathways of mitochondrial electron transport chain are important for the photosynthetic performance of pea plants under salinity stress conditions // *Plant Physiology and Biochemistry: PPB.* – 2020. – T. 154. – C. 248-259.
37. Araújo W. L. et al. Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture // *The Plant cell.* – 2011. – T. 23. – № 2. – C. 600–627.
38. Araújo W. L. et al. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues // *Plant, cell & environment.* – 2023. – T. 35 – № 1. – C. 1–21.
39. Athar HU. et al. Salt stress proteins in plants: An overview // *Front Plant Sci.* – 2022. – T. 13. – C. 999058.
40. Balasubramaniam T. et al. Plants' Response Mechanisms to Salinity Stress // *Plants.* – 2023. – T. 12. – № 12. – C. 2253.
41. Bandehagh A., Taylor N. L. Can Alternative Metabolic Pathways and Shunts Overcome Salinity Induced Inhibition of Central Carbon Metabolism in Crops? // *Frontiers in plant science.* – 2020. – № 11. – C. 1072.
42. Bartels A. et al. Dynamic DNA Methylation in Plant Growth and Development // *International journal of molecular sciences.* – 2018. – T. 19. – № 7. – C. 2144.
43. Belt K. et al. An Assembly Factor Promotes Assembly of Flavinated SDH1 into the Succinate Dehydrogenase Complex // *Plant physiology.* – 2018. – T. 177. – № 4. – C. 1439–1452.
44. Bo C. et al. Maize WRKY114 gene negatively regulates salt-stress tolerance in transgenic rice // *Plant cell reports.* – 2020. – T. 39. – № 1. – C. 135–148.
45. Bonomi F., Pagani S., Cerletti, P. (1981). Catalytic and molecular modifications of succinate dehydrogenase by monovalent inorganic anions // *European journal of biochemistry.* – 1981. – T. 119. – № 2. – C. 307–310.
46. Braun HP. The Oxidative Phosphorylation system of the mitochondria in plants // *Mitochondrion.* – 2020. – T. 53. – C. 66-75.

47. Cedar H., Sabag O., Reizel Y. The role of DNA methylation in genome-wide gene regulation during development // *Development*. – 2022. – T. 149. – № 2. – C. dev200118.
48. Chaudhry UK., Gökçe ZNÖ., Gökçe AF. The Influence of Salinity Stress on Plants and Their Molecular Mechanisms // *Biology and Life Sciences Forum*. – 2022. – T. 11. – № 1. – C. 31.
49. Chauveau M., Roussaux J. EPR Studies on 6-Benzoylaminopurine and Thenoyltrifluoroacetone Inhibition Sites of Succinate Dehydrogenase in Plant Mitochondria // *Plant and Cell Physiology*. – 1996. – T. 37. – № 7. – C. 914–921.
50. Che-Othman M. et al. The effects of sodium chloride on plant physiology and central carbon metabolism in wheat // *Transactions of the Malaysian Society of Plant Physiology*. – 2019. – № 26. – C. 179-186.
51. Che-Othman M. H. et al. Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress // *The New phytologist*. – 2020. – T. 225 – № 3. – C. 1166–1180.
52. Chen L. et al. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses // *Biochimica et biophysica acta*. – 2012. – T. 1819. – № 2. – C. 120–128.
53. Cheng C. et al. Wide-Range Portrayal of AP2/ERF Transcription Factor Family in Maize (*Zea mays* L.) Development and Stress Responses // *Genes*. – 2023. – T. 14. – №1. – C. 194.
54. Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.-K. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants // *Crop Science*. – 2005. – № 45. – C. 437-448.
55. Chiraz C.H. et al. Long-term salt stress responsive growth, carbohydrate metabolism, proline and anti-stress enzymes in *Nicotiana tabaccum* // *African Journal of Biotechnology*. – 2012. – T. 11. – № 32. – C. 8117-8126
56. Ciarmiello L. et al. Transcription Factors and Environmental Stresses in Plants // *Biological Techniques*. – 2014. – T. 1. – C. 57-72
57. Cimen H. et al. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria // *Biochemistry*. – 2010. – T. 49. – № 2. – C. 304–311.

58. Darst R. P. et al. Bisulfite sequencing of DNA // Current protocols in molecular biology. – 2010. Chapter 7. Unit 7.9.17.
59. Das P. et al. Exogenous silicon alters organic acid production and enzymatic activity of TCA cycle in two NaCl stressed indica rice cultivars // Plant physiology and biochemistry: PPB. – 2019. – № 136. – C. 76–91.
60. Davis B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1964. – T. 121. – C. 404–427.
61. Dias D. A. et al. Quantitative profiling of polar primary metabolites of two chickpea cultivars with contrasting responses to salinity // Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. – 2015. – № 1000. – C. 1–13.
62. Duan L. et al. Genome-wide identification and expression analysis of the bZIP transcription factor family genes in response to abiotic stress in *Nicotiana tabacum* L. // BMC Genomics. – 2022. – №23. – C. 318.
63. Ells HA. A colorimetric method for the assay of soluble succinic dehydrogenase and pyridinenucleotide-linked dehydrogenases // Arch Biochem Biophys. – 1959. – T. 85. – C. 561-562.
64. Eprintsev A. T et al. Expression and promoter methylation of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize under anoxic conditions // Journal of plant physiology. – 2017. – T. 216. – C. 197-201.
65. Eprintsev A. T. et al. Effect of Salt Stress on the Expression and Promoter Methylation of the Genes Encoding the Mitochondrial and Cytosolic Forms of Aconitase and Fumarase in Maize // International journal of molecular sciences. – 2021. – T. 22. – № 11. – C. 6012.
66. Eprintsev A. T. et al. Expression and promoter methylation of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize under anoxic conditions // Journal of plant physiology. – 2017.– № 216. – C. 197–201.
67. Eprintsev A. T. et al. Expression of genes encoding subunits A and B of succinate dehydrogenase in germinating maize seeds is regulated by methylation of their promoters // Journal of plant physiology. – 2016. – T. 205. – C. 33-40.

68. Eprintsev A. T. et al. The role of promoter methylation in the regulation of genes encoding succinate dehydrogenase in maize seedlings // Russ J Plant Physiol. – 2012. – T. 59. – C. 299-306.
69. Eprintsev A. T., Fedorin D. N., Igamberdiev A. U. Light-Dependent Expression and Promoter Methylation of the Genes Encoding Succinate Dehydrogenase, Fumarase, and NAD-Malate Dehydrogenase in Maize (*Zea mays* L.) Leaves. // International journal of molecular sciences. – 2023. – T. 24. – № 12. – C. 10211.
70. Eprintsev A.T. et al. The role of promoter methylation in the regulation of genes encoding succinate dehydrogenase in maize seedlings // Russ J Plant Physiol – 2012. – № 59. – C. 299–306.
71. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Florez Caro O.J. Epigenetic Mechanism for Regulation of Gene Expression of Membrane-Bound Subunit C Succinate Dehydrogenase in Sprouting Corn Seeds // Russ J Plant Physiol – 2022. – № 69. – C. 24.
72. Eprintsev A.T., Fedorina O.S. Functioning of Malate Dehydrogenase System in Mesophyll and Bundle Sheath Cells of Maize Leaves under Salt Stress Conditions // Russ. J. Plant Physiol. – 2007. – T. 54. – C. 728–735.
73. Eprintsev A.T., Fedorina, O.S., Bessmeltseva Y.S. Response of the malate dehydrogenase system of maize mesophyll and bundle sheath to salt stress // Russ J Plant Physiol – 2011. – № 58. – C. 448–453.
74. Eubel H. New Insights into the Respiratory Chain of Plant Mitochondria. Supercomplexes and a Unique Composition of Complex II // Plant Physiology. – 2003. – № 1. – C. 274–286.
75. Fang Y. et al. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice // Mol Genet Genomics. – 2008. – T. 280. – №6. – C. 547-563.
76. Fedorin D.N. et al. 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. – C. 68.

- 77.Ferreira L. et al. Salt Tolerant and Sensitive Rice Varieties Display Differential Methylome Flexibility under Salt Stress. // PloS one. – 2015. – T. 10. –№ 5. – C. e0124060.
- 78.Figueroa P. et al. The four subunits of mitochondrial respiratory complex II are encoded by multiple nuclear genes and targeted to mitochondria in *Arabidopsis thaliana* // Plant molecular biology. – 2002. – T. 50. – № 4-5. – C. 725–734.
- 79.Foerster A. M., Mittelsten Scheid, O. Analysis of DNA methylation in plants by bisulfite sequencing // Methods in molecular biology – 2010. – T. 631. – C. 1–11.
- 80.Fu H, Yang Y. How Plants Tolerate Salt Stress // Curr Issues Mol Biol. – 2023. – T. 45. –№ 7. – C. 5914-5934.
- 81.Fuentes D. et al. A deficiency in the flavoprotein of *Arabidopsis* mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen-limiting conditions // Plant physiology. – 2011. – T. 157. –№ 3. – C. 1114–1127.
- 82.Gai WX. et al. Characterization of the bZIP Transcription Factor Family in Pepper (*Capsicum annuum* L.): *CabZIP25* Positively Modulates the Salt Tolerance // Front Plant Sci. – 2020. – №11. – C. 139.
- 83.Gavaghan C. L. et al. Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize (*Zea mays*) // Phytochem. Anal. – 2011. – № 22. – C. 214–224.
- 84.Gong Y. et al. Genome-Wide Identification and Salt Stress Response Analysis of the bZIP Transcription Factor Family in Sugar Beet // Int J Mol Sci. – 2022. – T. 23. – № 19. – C. 11573.
- 85.Gutman M. Modulation of mitochondrial succinate dehydrogenase activity, mechanism and function // Mol Cell Biochem. – 1978.– № 20. – C. 41–60.
- 86.Hagerhall C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme // Biochim Biophys Acta. – 1997. – T. 1320 – № 2. – C. 107–141
- 87.Hajjawi O.S., Hider R.C. Asymmetry of the malonate transport system in human red blood cells // European Journal of Scientific Research. – 2009. – T. 31. – № 4. – C. 534-545.

- 88.Hajjawi, O.S. Succinate dehydrogenase: assembly, regulation and role in human disease // *European Journal of Scientific Research*. – 2011. – T. 51. –№ 4. – C. 133-142.
- 89.Hamilton E. W., Heckathorn, S. A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine // *Plant physiology*. – 2001. – T. 126. – № 3. – C. 1266–1274.
- 90.Hasanuzzaman M, Fujita M. Plant Responses and Tolerance to Salt Stress: Physiological and Molecular Interventions // *Int J Mol Sci*. – 2022. – T. 23. –№ 9. – C. 4810.
- 91.He XJ., Chen T., Zhu JK. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals // *Cell Res*. – 2011. – T. 21.– C. 442–465.
- 92.Hill C. B. et al. Characterization of ion contents and metabolic responses to salt stress of different *Arabidopsis AtHKT1;1* genotypes and their parental strains // *Molecular plant*. – 2013. – T. 6. – № 2. – C. 350–368.
- 93.Hu W. et al. Genome-wide identification and analysis of WRKY gene family in maize provide insights into regulatory network in response to abiotic stresses // *BMC Plant Biol*.– 2021. – №21. – C. 427.
- 94.Huang CY, Jin H. Coordinated Epigenetic Regulation in Plants: A Potent Managerial Tool to Conquer Biotic Stress // *Front Plant Sci*. – 2022. – T. 12.– C. 795274.
- 95.Huang L. S. Crystallographic studies of the binding of ligands to the dicarboxylate site of Complex II, and the identity of the ligand in the "oxaloacetate-inhibited" state // *Biochimica et biophysica acta*. – 2006. – T. 1757. – № 9-10. – C. 1073–1083.
- 96.Huang S. et al. 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme // *J Biol Chem*. – 2006. – T. 281. – № 9. – C. 5965-5972.
- 97.Huang S. et al. Mitochondrial complex II of plants: subunit composition, assembly, and function in respiration and signaling // *Plant J*. – 2019. – T. 98. – № 4. – C. 405-417.

98. Huang S. et al. Succinate dehydrogenase assembly factor 2 is needed for assembly and activity of mitochondrial complex II and for normal root elongation in *Arabidopsis* // *The Plant journal: for cell and molecular biology*. – 2013. – T. 73. – № 3. – C. 429–441.
99. Hurkman W. J. Effect of salt stress on plant gene expression: A review // *Plant Soil*. – 1992. – T. 146. – C. 145-151.
100. Hussain Q. et al. Transcription Factors Interact with ABA through Gene Expression and Signaling Pathways to Mitigate Drought and Salinity Stress // *Biomolecules*. – 2021. – T. 11. – № 8. – C. 1159.
101. Jacoby R. P. et al. Analysis of the sodium chloride-dependent respiratory kinetics of wheat mitochondria reveals differential effects on phosphorylating and non-phosphorylating electron transport pathways // *Plant, cell & environment*. – 2016. – T. 39. – № 4. – C. 823–833.
102. Jacoby R. P., Millar A. H., Taylor N. L. Assessment of respiration in isolated plant mitochondria using Clark-type electrodes // *Methods Mol. Biol.* – 2015. – T. 1305. – C. 165-185.
103. Jacoby R. P., Taylor N. L., Millar, A. H. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance // *Trends in plant science*. – 2011. – T. 16 – № 11. – C. 614–623.
104. Jakubowski H. Fundamentals of biochemistry II - Bioenergetics and Metabolism, LibreText book College of St. Benedict/St. John's University, 2024 16.2.14
105. Javed T. et al. Transcription Factors in Plant Stress Responses: Challenges and Potential for Sugarcane Improvement // *Plants (Basel, Switzerland)*. – 2020. – T. 9. – № 4. – C. 491.
106. Jiang Y, Deyholos MK. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes // *BMC Plant Biol.* – 2006. – №6. – C. 25.

107. Johnson J.D. et al. Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes // *J. Biol. Chem.* – 1998. —№ 273. – C. 27580–27586.
108. Kaludercic N., Giorgio V. The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2016. – 3869610.
109. Kearney K. B. et al. Activation of succinate dehydrogenase by anions and pH // *The Journal of biological chemistry.* – 1974. – T. 249. – № 7. – C. 2016-2020.
110. Kesawat MS. et al. Regulation of Reactive Oxygen Species during Salt Stress in Plants and Their Crosstalk with Other Signaling Molecules-Current Perspectives and Future Directions // *Plants (Basel).* – 2023. – T. 12. –№ 4. – C. 864.
111. Kim H. J. et al. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes // *Biochimica et biophysica acta.* – 2012. – T. 1823. – № 9. – C. 1604–1616.
112. Kim H. J., Winge, D. R. Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase // *Biochimica et biophysica acta.* – 2013. – T. 1827 – № 5. – C. 627–636.
113. Kregiel D. Succinate Dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* – The Unique Enzyme of TCA Cycle / D. Kregiel. – Current Knowledge and New Perspectives. InTech, 2012. – C. 211-234
114. Kuhlmann M. et al. DNA Methylation in Plants Associated with Abiotic Stress // *Front Plant Sci.* – 2021. – T. 12. – C. 778004.
115. Kumari A. Sweet Biochemistry. Chapter 2 - Citric Acid Cycle / A. Kumari. – Academic Press: – 2018. – C. 7-11, ISBN 9780128144534.
116. Lee P. Y. et al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments // *Journal of visualized experiments: JoVE.* – 2012. – № 62. – C. 3923.
117. León G., Holuigue L., Jordana X. Mitochondrial complex II Is essential for gametophyte development in *Arabidopsis* // *Plant physiology.* – 2007. – T. 143. –№ 4. – C. 1534–1546.

118. Li C. et al. LPS1, Encoding Iron-Sulfur Subunit SDH2-1 of Succinate Dehydrogenase, Affects Leaf Senescence and Grain Yield in Rice // International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 22. – № 1. – C. 157.
119. Li H. et al. *ZmWRKY33*, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis* // Plant Growth Regul. – 2013. – №70. – C. 207–216.
120. Li L. C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs // Bioinformatics (Oxford, England). –2002. – T. 18. – № 11. – C. 1427-1431.
121. Li M. et al. *GmNAC06*, a NAC domain transcription factor enhances salt stress tolerance in soybean // Plant Mol Biol.– 2021. – №105. – C. 333–345.
122. Li P. et al. Genome-Wide Identification of NAC Transcription Factors and Their Functional Prediction of Abiotic Stress Response in Peanut // Front Genet. – 2021. – №12. – C. 630292.
123. Li W. et al. Function and Mechanism of WRKY Transcription Factors in Abiotic Stress Responses of Plants // Plants (Basel, Switzerland). – 2020. – T. 9. – № 11. – C. 1515.
124. Li Y. et al. The mitochondrial LYR protein SDHAF1 is required for succinate dehydrogenase activity in *Arabidopsis* // The Plant journal: for cell and molecular biology. — 2022. — T. 110. — № 2. — C. 499-512.
125. Liang C. et al. GhABF2, a bZIP transcription factor, confers drought and salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Sci Rep. – 2016. – №6. – C. 35040.
126. Lindberg S, Premkumar A. Ion Changes and Signaling under Salt Stress in Wheat and Other Important Crops // Plants (Basel). – 2023. – T. 13. – № 1. – C. 46.
127. Lineweaver H., Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants // Journal of the American Chemical Society. – 1934. – T. 56. – C. 658-666.
128. Liu H. et al. Role of bZIP Transcription Factors in Plant Salt Stress // Int J Mol Sci. – 2023. – T. 24. – № 9. – C. 7893.

129. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method // *Methods*. – 2001. – T. 25. – № 4. – C. 402-408.
130. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biologi.* – 1951. – T. 193. – C. 265-275.
131. Lu C. et al. Salt Stress Inhibits Photosynthesis and Destroys Chloroplast Structure by Downregulating Chloroplast Development-Related Genes in *Robinia pseudoacacia* Seedlings // *Plants*. – 2023. – T. 12. – № 6. – C. 1283.
132. Lucibelli F., Valoroso M. C., Aceto, S. Plant DNA Methylation: An Epigenetic Mark in Development, Environmental Interactions, and Evolution // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – T. 23. – № 15. – C. 8299.
133. Ma Z, Hu L, Jiang W. Understanding AP2/ERF Transcription Factor Responses and Tolerance to Various Abiotic Stresses in Plants: A Comprehensive Review // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – T. 25. – №2. – C. 893.
134. Mailloux R. J. Still at the Center of it All; Novel Functions of the Oxidative Krebs Cycle // *Bioenergetics*. – 2015. – T. 4 – № 1. – C. 122.
135. Manbir. et al. Alternative oxidase plays a role in minimizing ROS and RNS produced under salinity stress in *Arabidopsis thaliana* // *Physiologia Plantarum*. – 2022. – T. 174. – № 2. – e13649.
136. Meraj T. A. et al. Transcriptional Factors Regulate Plant Stress Responses through Mediating Secondary Metabolism. *Genes*. – 2020. – T. 11. – № 4. – C. 346.
137. Millar A. H. et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits // *Plant molecular biology*. – 2004. – T. 56. – № 1. – C. 77-90.
138. Millar A.H, Liddell A, Leaver CJ. Isolation and subfractionation of mitochondria from plants // *Methods Cell Biol.* – 2007. – T. 80 – C. 65-90.
139. Moosavi B. et al. Genetic, epigenetic and biochemical regulation of succinate dehydrogenase function // *Biological chemistry*. – 2020. – T. 401 – № 3. – C. 319-330.

140. Na U. et al. The LYR factors SDHAF1 and SDHAF3 mediate maturation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase // *Cell metabolism*. —2014. — T. 20. — № 2. — C. 253-266.
141. Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice // *Plant Physiol.* — 2006. — T. 140. — №2. — C. 411-432.
142. Nan N. et al. Rice plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase 1 negatively regulates salt stress response by reducing the vitamin B6 content. // *Plant biotechnology journal*. — 2016. — T. 18. — № 1. — C. 172–184.
143. Nath A. K. et al. PTPMT1 Inhibition Lowers Glucose through Succinate Dehydrogenase Phosphorylation // *Cell reports*. — 2015. — T. 10. —№ 5. — C. 694–701.
144. Nelson B. D. et al. Effect of thenoyltrifluoroacetone on the interaction of succinate dehydrogenase and cytochrome b in ubiquinone-depleted submitochondrial particles // *Biochemical and biophysical research communications*. — 1971. — T. 44. —№ 6. — C. 1312–1320.
145. Nesterenko M.V. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels / M.V. Nesterenko, M. Tilley, S.J. Upton // *J. Biochem. Biol.* — 1994. — Vol. 28. — P. 239–242.
146. Omidbakhshfard M. A. et al. Effect of salt stress on genes encoding translation-associated proteins in *Arabidopsis thaliana* // *Plant signaling & behavior*. — 2012. — T. 7. — № 9. — C. 1095-1102.
147. Oyedotun K. S., Lemire B. D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies // *The Journal of biological chemistry*. — 2004. — T. 279 — № 10. — C. 9424–9431.
148. Petrillo E. et al. Let there be light: regulation of gene expression in plants // *RNA Biol.* — 2014. — T. 11. — № 10. — C. 1215-1220.

149. Pettinato E, Böhnert P, Berg IA. Succinyl-CoA:acetate CoA-transferase functioning in the oxidative tricarboxylic acid cycle in *Desulfurella acetivorans* // *Front Microbiol.* – 2022. – T. 13. – C.1080142.
150. Piedrafita G., Keller MA., Ralser M. The Impact of Non-Enzymatic Reactions and Enzyme Promiscuity on Cellular Metabolism during (Oxidative) Stress Conditions // *Biomolecules.* – 2015. – T. 5. – №3. – C. 2101-2122.
151. Pikaard C. S., Mittelsten Scheid, O. Epigenetic regulation in plants // *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* – 2014. – T. 6. – № 12. – C. a019315.
152. Popov V. N. et al. Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A // *FEBS Lett.* – 2010. – T. 584. – C. 199-202.
153. Read A. D. et al. Mitochondrial iron-sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology // *Redox biology.* – 2021. – № 47. – C. 102164.
154. Rezayian M., Niknam V., Arabloo M. Iron nanoparticle regulate succinate dehydrogenase activity in canola plants under drought stress // *Sci Rep.* – 2023. — № 13. – C. 9628.
155. Riaz MW. et al. Expansion and Molecular Characterization of AP2/ERF Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Front Genet.* – 2021. – №12. – C. 632155.
156. Robertson R. N., Wilkins, M. Quantitative relation between salt accumulation and salt respiration in plant cells // *Nature.* – 1948. – T. 161 – № 4081 – C. 101.
157. Rutter J., Winge D. R., Schiffman, J. D. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease // *Mitochondrion.* – 2010. – T. 10 – № 4. – C. 393–401.
158. Saha P., Kunda P., Biswas A. K. Influence of sodium chloride on the regulation of Krebs cycle intermediates and enzymes of respiratory chain in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) seedlings. // *Plant physiology and biochemistry: PPB.* – 2012. – № 60, – C. 214–222.
159. Schertl P., Braun, H. P. Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria // *Frontiers in plant science.* – 2014. – T. 5. – C. 163.
160. Schilling B. et al. Proteomic analysis of succinate dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c reductase (Complex II and III) isolated by

- immunoprecipitation from bovine and mouse heart mitochondria // *Biochim Biophys Acta*. – 2006. – T. 1762. – №2. – C. 213-222.
161. Schnarrenberger C, Martin W. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer // *Eur J Biochem*. – 2002. – T. 269. – № 3. – C. 868-883.
162. Schwarzländer M., Fricker M. D., Sweetlove, L. J. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge // *Biochimica et biophysica acta*. – 2009. – T. 1787 – № 5. – C. 468–475.
163. Serra TS. et al. OsRMC, a negative regulator of salt stress response in rice, is regulated by two AP2/ERF transcription factors // *Plant Mol Biol*. – 2013. – T. 8239. – №4-5. – C. 439-455.
164. Shao H, Wang H, Tang X. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects // *Front Plant Sci*. – 2015. – №6. – C. 902.
165. Sharma M, et al. Understanding plant stress memory response for abiotic stress resilience: Molecular insights and prospects // *Plant Physiol Biochem*. – 2022 – № 179 – C. 10-24.
166. Sheen J. Metabolic repression of transcription in higher plants // *Plant Cell*. – 1990. – T. 2. – № 10. – C. 1027-1038.
167. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // *Anal Chem*. – 1996. – T. 68. – № 5. – C. 850-858.
168. Shi Y. et al. OsMDH12: A Peroxisomal Malate Dehydrogenase Regulating Tiller Number and Salt Tolerance in Rice // *Plants*. – 2023. – T. 12. – № 20. – C. 3558.
169. Shrivastava P., Kumar R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation // *Saudi journal of biological sciences*. – 2015. – T. 22. – № 2. – C. 123-131.

170. Singh P. et al. Salt stress resilience in plants mediated through osmolyte accumulation and its crosstalk mechanism with phytohormones // *Front Plant Sci.* – 2022. – T. 13. – C. 1006617.
171. Smith C.A et al. Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Physiologia Plantarum.* – 2009. – T. 137. – № 4. –C. 459–472.
172. Song Y. et al. The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean // *PloS one.* – 2012. – T. 7. –№ 7. – C. e41274.
173. Souer E. et al. The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries // *Cell.* – 1996. – T. 85. – №2. – C. 159–170.
174. Studart-Guimarães C. et al. Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves // *Plant physiology.* – 2012. – T. 145. – № 3. – C. 626–639.
175. Sun F. et al. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II // *Cell.* – 2005. – T. 121 – № 7. – C. 1043–1057.
176. Sun M. et al. DNA Methylation in Plant Responses and Adaption to Abiotic Stresses // *Int J Mol Sci.* – 2022. – T. 23. – № 13. – C. 6910.
177. Sweetman C. et al. Identification of Alternative Mitochondrial Electron Transport Pathway Components in Chickpea Indicates a Differential Response to Salinity Stress between Cultivars // *Int J Mol Sci.* – 2020. – T. 21. – № 11. – C. 3844.
178. Talanova V.V. et al. Expression of WRKY transcription factor and stress protein genes in wheat plants during cold hardening and ABA treatment // *Russ J Plant Physiol.* – 2009.– № 56. – C. 702–708.
179. Tang H, Zhu H. Specific Changes in Morphology and Dynamics of Plant Mitochondria under Abiotic Stress // *Horticulturae.* – 2023. – T. 9. – № 1. –C. 11.
180. Temel, A. Epigenetic Regulation in Plants / A. Temel, B. Janack, K. Humbeck. – In eLS: John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), 2015.

181. Thiebaut F, Hemerly AS, Ferreira PCG. A Role for Epigenetic Regulation in the Adaptation and Stress Responses of Non-model Plants // *Front Plant Sci.* – 2019. – T. 10. – C. 246.
182. Tokmakov AA, Kurotani A, Sato KI. Protein pI and Intracellular Localization // *Front Mol Biosci.* – 2021. – № 8. – C. 775736.
183. Tran D. Q. et al. NaCl-stimulated ATP synthesis in mitochondria of a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. // *Plant Production Science.* — 2020. — T. 23. — № 1. — C. 129–135.
184. Van de Venter H. A. Cyanide-resistant respiration and cold resistance in seedlings of maize (*Zea mays* L.) // *Annals of Botany.* – 1985. – T. 56. – C. 561-563.
185. Vennapusa A. R. et al. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber // *Sci Rep.* – 2020. – T. 10. – C. 16887.
186. Wang Q. J. et al. The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the cytosolic malate dehydrogenase gene in transgenic apple plants // *Plant biotechnology journal.* – 2023. – T. 14. – № 10. – C. 1986–1997.
187. Widodo, Patterson, J. H. et al. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance // *Journal of experimental botany.* – 2009. – T. 60. – № 14. – C. 4089–4103.
188. Wu D. et al. Tissue metabolic responses to salt stress in wild and cultivated barley // *PloS one.* – 2013. – T. 8. – № 1. – C. e55431.
189. Xie S. S., Duan C. G. Epigenetic regulation of plant immunity: from chromatin codes to plant disease resistance // *aBIOTECH.* – 2023. – T. 4. – № 2. – C. 124–139.
190. Xu N. et al. Effects of salt stress on seed germination and respiratory metabolism in different *Flueggea suffruticosa* genotypes // *PeerJ.* – 2023. – № 11. – C. e15668.

191. Yadav S. et al. DNA methylation: an emerging paradigm of gene regulation under drought stress in plants // Mol Biol Rep. – 2024. – T. 51. – № 1. – C. 311.
192. Yankovskaya V. et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation // Science. – 2003. – T. 299 – № 5607. – C. 700–704.
193. Yao Y.X. et al. The functions of an apple *cytosolic malate dehydrogenase* gene in growth and tolerance to cold and salt stresses // Plant Physiol. Biochem. – 2011. – T. 49. – C. 257–264.
194. Zangi R, Arrieta A, Cossío FP. Mechanism of DNA methylation: the double role of DNA as a substrate and as a cofactor // J Mol Biol. – 2010. – T. 400. – № 3. – C. 632-644.
195. Zhang H. Lang, Z. Zhu J. K. Dynamics and function of DNA methylation in plants // Nature reviews. Molecular cell biology. – 2018. – T. 19. –№ 8. – C. 489–506.
196. Zhang J. et al. Metabolic Profiles Reveal Changes in Wild and Cultivated Soybean Seedling Leaves under Salt Stress // PloS one. – 2016. – T. 11. – № 7. – C. e0159622.
197. Zhang K. et al. Transcriptome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors involved in regulating Taxol biosynthesis in Taxus // Industrial Crops and Products. – 2022. – T. 176. – C. 114373.
198. Zhang M. et al. The bZIP Transcription Factor GmbZIP15 Negatively Regulates Salt- and Drought-Stress Responses in Soybean // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – T. 21. – №20. – C. 7778.
199. Zhang X. et al. Succinate dehydrogenase SDH1–1 positively regulates cotton resistance to *Verticillium dahliae* through a salicylic acid pathway // J. Cotton Res. – 2020. –№ 3. – C. 1–12.
200. Zhang Y., Fernie, A. R. The Role of TCA Cycle Enzymes in Plants // Advanced biology. – 2023. – T. 7 – № 8. e2200238.
201. Zhao S. et al. Regulation of Plant Responses to Salt Stress // International journal of molecular sciences. – 2021. – T. 22. –№ 9. – C. 4609.

202. Zhu M. et al. Basic leucine zipper transcription factor SlbZIP1 mediates salt and drought stress tolerance in tomato // BMC Plant Biol. – 2018. – № 18. – C. 83.

ПРИЛОЖЕНИЕ

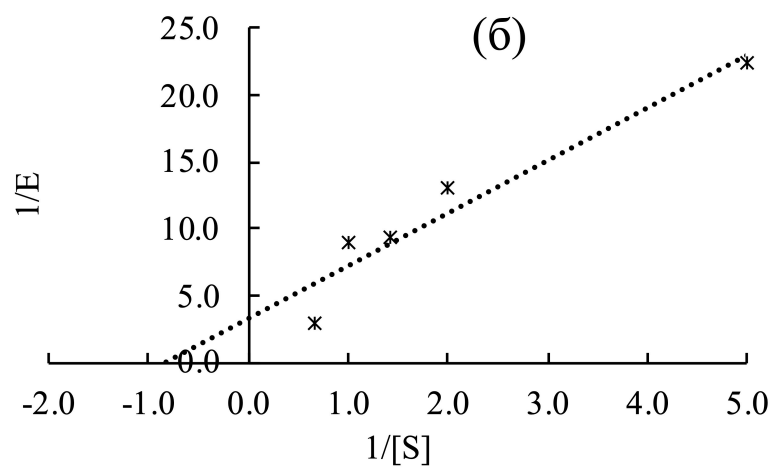
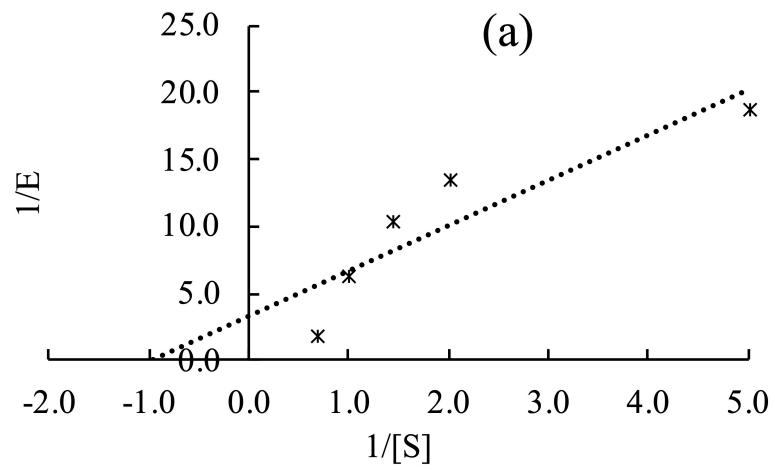


Рис. 1. Определение константы Михаэлиса-Ментен (K_M) а. изоформа 1 СДГ (контроль); б. изоформа 1 СДГ (NaCl) *Triticum aestivum* L.

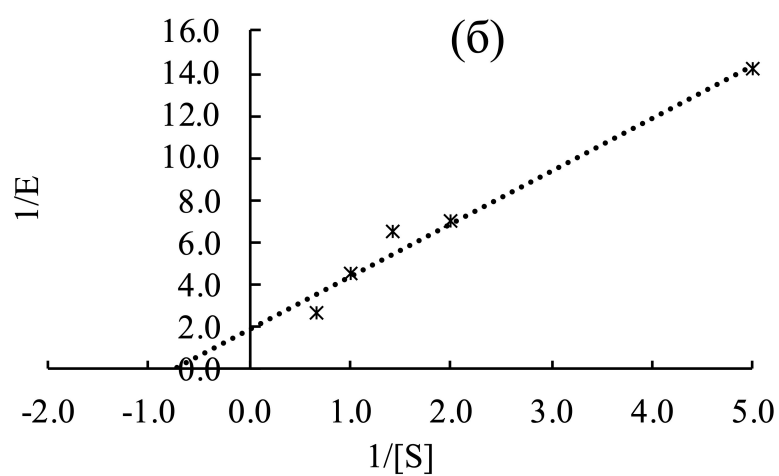
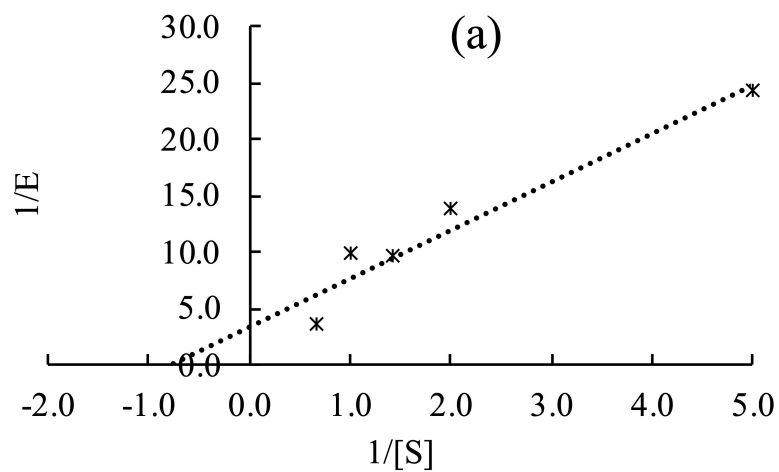


Рис. 2. Определение константы Михаэлиса-Ментен (K_M) а. изоформа 2 СДГ (контроль); б. изоформа 2 СДГ (NaCl) *Triticum aestivum* L.

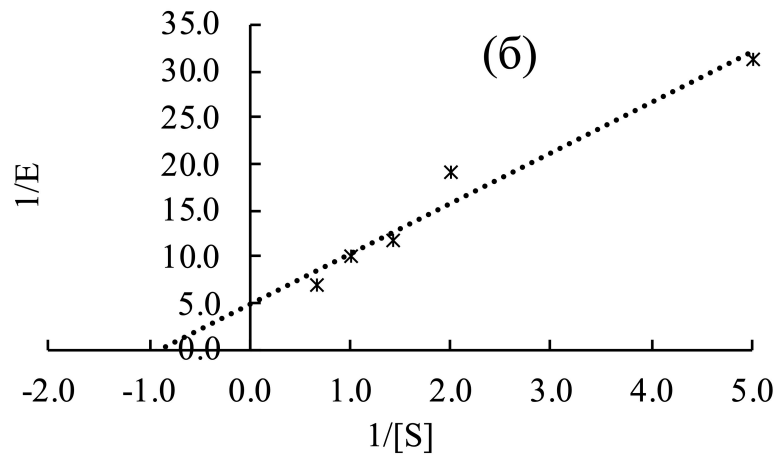
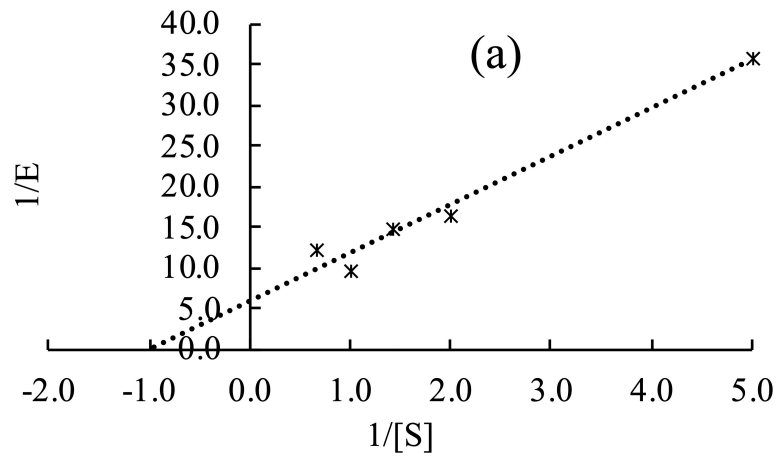


Рис. 3. Определение константы Михаэлиса-Ментен (K_M) а. изоформа 1 СДГ (контроль); б. изоформа 1 СДГ (NaCl) *Zea mays L.*

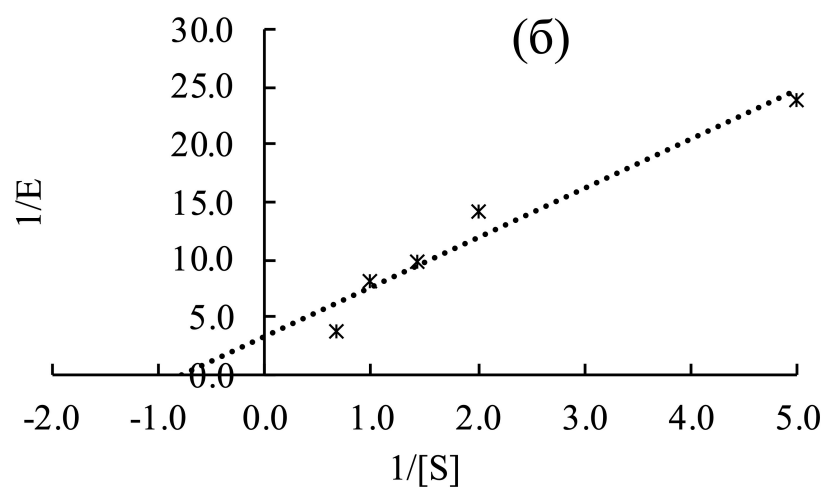
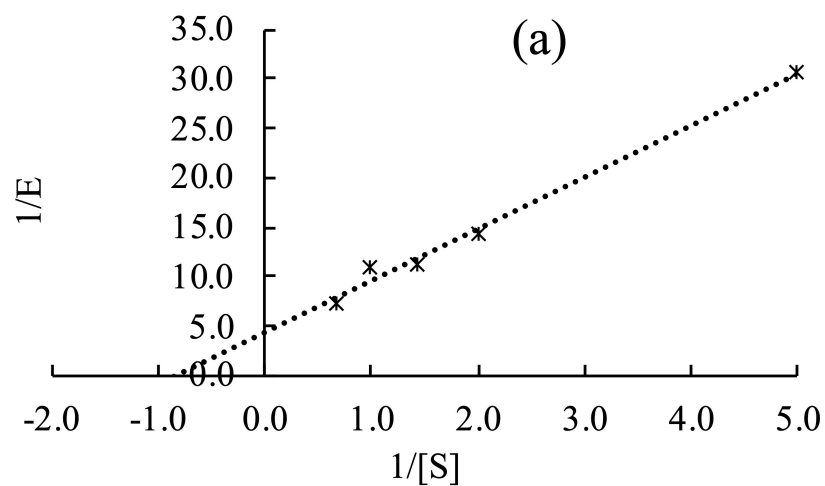


Рис. 4. Определение константы Михаэлиса-Ментен (K_M) а. изоформа 2 СДГ (контроль); б. изоформа 2 СДГ (NaCl) *Zea mays L.*

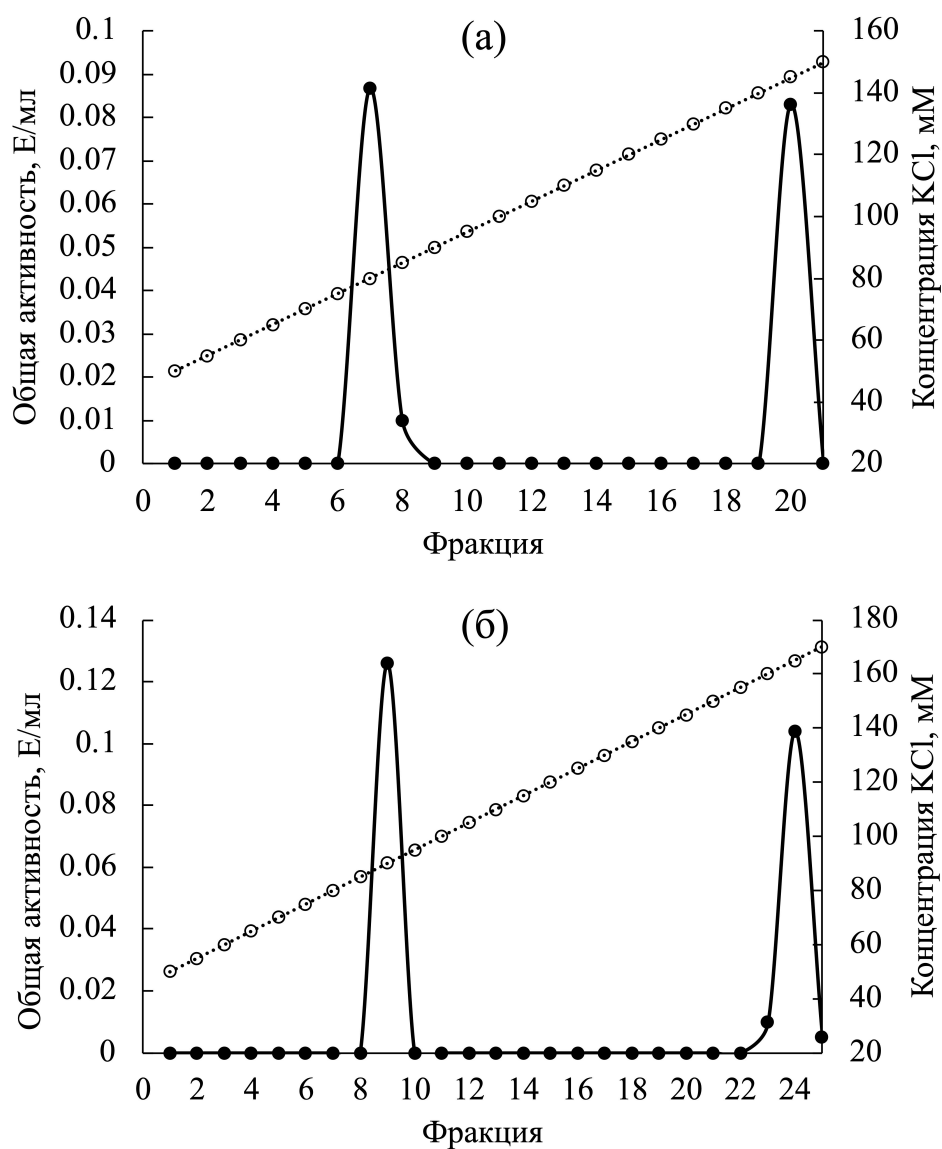


Рис. 5. Профили элюирования с колонки ионообменной хроматографии изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев *Zea mays L.*: а – контрольные растения (H₂O), б – опытные растения (150 мМ NaCl) [15].

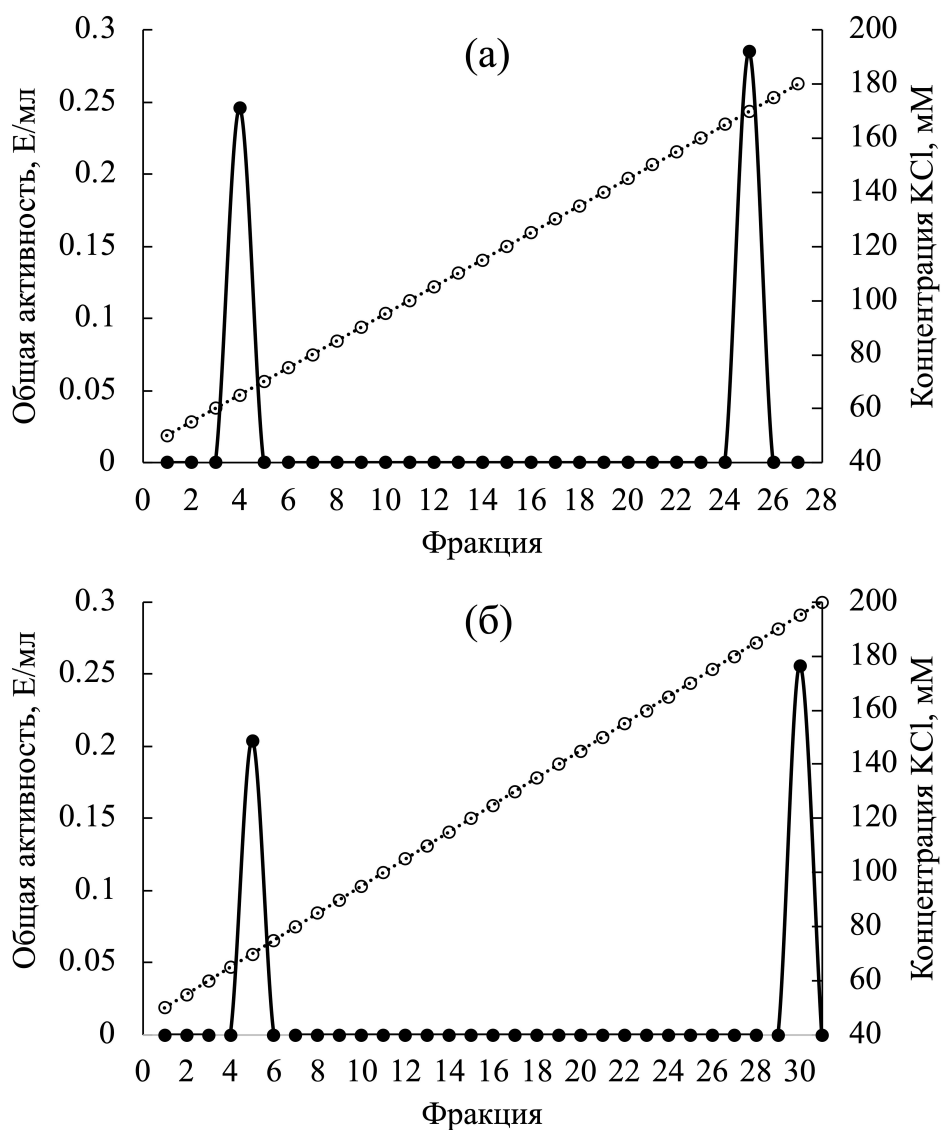


Рис. 5. Профили элюирования с колонки ионообменной хроматографии изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев *Triticum aestivum L.*: а – контрольные растения (H₂O), б – опытные растения (150 мМ NaCl)

Таблица 1.

Предсказанные сайты связывания из семейства транскрипционных факторов WRKY и NAC в промоторах генов сукцинатдегидрогеназы *Triticum aestivum* L.

Пороговое значение $p \leq 1 \cdot 10^{-4}$

Ген	Транскрипционный фактор	Семейство	Положение	Последовательность
<i>TaSDH1</i>	Traes_1AL_0404BC790	WRKY	5-13	CGAGCCCAC
	Traes_1AS_1432A2F79	WRKY	392-410	AAACGTCGATGGCGCCGGT
	Traes_1DS_A6733B734	WRKY	392-410	AAACGTCGATGGCGCCGGT
	Traes_2AL_15A7BB684	WRKY	136-154	CCTCCTCTTCGACCGATAC
	Traes_2AS_C407071E4	WRKY	164-178	GGGCGGCGGCGACG
	Traes_2BL_A69F6C5DF	WRKY	675-684	GAGAATCTCA
	Traes_2BS_F3097F116	WRKY	398-412	GCACCGGCGCCATCG
	Traes_5BL_90757F0CC	WRKY	86-100	TTACAGCCGCCGCC
	Traes_5DS_5DEA5C9E3	WRKY	288-300	CATCTGGATCTAT
	Traes_6AL_BA4636569	WRKY	157-170	GGCGACGGCGGCGG
	Traes_6AS_68775100B	WRKY	419-433	GAAGCTGACGTTGAC
	Traes_6BL_DD840863A	WRKY	701-712	AGAAAGAGAGAT
	Traes_7DL_A9EF00572	WRKY	218-234	CGGTGTGGTTCGAGGAG
	Traes_7DS_01F74C6F3	WRKY	229-243	GTGTGGCGGCGGTGT
	TRAES3BF003800010CFD_g	WRKY	525-532	GGGTCCAC
	TRAES3BF058500060CFD_g	WRKY	421-431	CAACGTCAGCT
<i>TaSDH2</i>	Traes_5BL_CC18CAD72	NAC	152-166	TTTTATTAGTTAAAT
	TRAES3BF003800010CFD_g	WRKY	439-452	CGAGAGGAGGAAAA
	Traes_5BL_17A712C94	WRKY	439-452	CGAGAGGAGGAAAA
<i>TaSDH3-2</i>	Traes_6BL_A169A3ECB	NAC	457-464	CGTCGCCG
	Traes_6AL_0D7866801	NAC	268-288	TATAATCGAGAAAAGGAACAT
	Traes_5DL_0924913F8	NAC	458-472	CCAGGCGGCGGCGAC
	Traes_5DL_0924913F8	NAC	841-854	ATATTTACATTATT
	Traes_5BL_39FF03C5D	NAC	10-17	CCACGTGT
	Traes_5BL_39FF03C5D	NAC	293-312	ATAAAGAAGACAAAAAAGT
<i>TaSDH4</i>	Traes_1BL_8925B27BC	NAC	317-334	CAAAAAAAGAAAAAAT
	Traes_5DL_0924913F8	NAC	496-516	AAGTCCTTTTTTTTTTCTTT
	Traes_5BL_39FF03C5D	NAC	323-337	ACTCAAAAAAGAAA
	Traes_5BL_CC18CAD72	NAC	25-38	CTTAGATTTGCTTC
	Traes_5DL_0924913F8	NAC	437-464	TGCTCGCAGCTGCCGCATGCTGGGCGTC
	Traes_5BL_39FF03C5D	NAC	606-629	AGAAAAAGGAAAAAGGAAAAAAA
	Traes_6AL_8BA1FF8B2	NAC	606-629	AGAAAAAGGAAAAAGGAAAAAAA

Таблица 2.

Предсказанные сайты связывания из семейства транскрипционных факторов WRKY и NAC в промоторах генов сукцинатдегидрогеназы *Zea mays L.*

Пороговое значение $p \leq 1 \cdot 10^{-4}$

Ген	Транскрипционный фактор	Семейство	Положение	Последовательность
<i>ZmSDH1-2</i>	AC198725.4_FG009	WRKY	773-785	GGTGTGACGTC
	GRMZM2G018721	WRKY	401-410	GTAGTCAAGG
	GRMZM2G031963	WRKY	402-409	TAGTCAAG
	GRMZM2G048450	WRKY	175-187	TGGTTTGTCTTTA
	GRMZM2G054125	WRKY	400-412	GGTAGTCAAGGTT
	GRMZM2G057116	WRKY	290-302	GATTGGCCTTTTT
	GRMZM2G111354	WRKY	289-302	CGATTGGCCTTTTT
	GRMZM2G120320	WRKY	288-302	ACGATTGGCCTTTTT
	GRMZM2G127064	WRKY	773-784	GGTGTGACGTC
	GRMZM2G042494	NAC	778-788	TGACGTCACCA
	GRMZM2G166721	NAC	779-793	GACGTCACCAAGGAG
<i>ZmSDH2-3</i>	GRMZM2G456568	NAC	624-644	GGCAACATGACCTGCAAGTCA
<i>ZmSDH3-1</i>	GRMZM2G042494	NAC	250-260	ACACGGATATG
	GRMZM2G166721	NAC	496-510	AATTTATAAGTAAAG
	AC198725.4_FG009	WRKY	380-392	TTTCTTGACCTCT
	GRMZM2G018721	WRKY	458-467	AAGGTAAACC
	GRMZM2G048450	WRKY	11-23	TACTTTGAATTTA
	GRMZM2G057116	WRKY	613-625	GATTGACTAGGGT
	GRMZM2G102583	WRKY	345-358	AGGGTTGGCCCTCT
	GRMZM2G111354	WRKY	381-394	TTCTTGACCTCTTC
GRMZM2G120320	WRKY	380-394	TTTCTTGACCTCTTC	
<i>ZmSDH4</i>	GRMZM2G432583	WRKY	558-565	TAGTAAAC
	GRMZM2G453571	WRKY	650-660	TCCAGTCAAAA
	GRMZM2G382350	WRKY	652-659	CAGTCAAA
	GRMZM2G120320	WRKY	36-50	AAGGTTGGCTATAGA
	GRMZM2G018721	WRKY	445-454	ACTGTCAAAT
	GRMZM2G127064	WRKY	331-342	ACAGTGGACTTG
	GRMZM2G179885	NAC	447-463	TGTCAAATACAAGCAAC

Праймеры для метил-специфичной ПЦР к генам СДГ [76].

Ген	Цитозина	Название	Последовательность
<i>ZmSDH1-2</i>	1	Прямой-М	TGTATAAAAATAAGGATGTGTTTCGT
		Обратный-М	ATAAAACAACACATATATACCCGAC
		Прямой-U	TGTATAAAAATAAGGATGTGTTTGT
		Обратный-U	ATAAAACAACACATATATACCCAAC
	2	Прямой-М	CGGTATATAGTGTGTTTGTATATCGT
		Обратный-М	AAAACATATCGTTCATATAACCGT
		Прямой-U	TGGGTATATAGTGTGTTTGTATATTGT
		Обратный-U	AAAACATATCATTCATATAACCATT
<i>ZmSDH2-3</i>	1	Прямой-М	TTTTATACGATCGAGTTAGTACG
		Обратный-М	AAAATATCTTTAAATAAATCTTAAACC
		Прямой-U	TTTTTTATATGATTGAGTTAGTATG
		Обратный-U	AAAATATCTTTAAATAAATCTTAAACC
	2	Прямой-М	TTAATAATATCAACAAGCG
		Обратный-М	TTAGTTATAAATTTTGATTG
		Прямой-U	TTAATAATATCAACAACG
		Обратный-U	TTAGTTATAAATTTTGATTG
	3	Прямой-М	AAATCTTCTTTCACCCGCT
		Обратный-М	TTAGTTATAAATTTTGATTG
		Прямой-U	AAATCTTCTTTCACCCACT
		Обратный-U	TTAGTTATAAATTTTGATTG
<i>ZmSDH3-1</i>	1	Прямой-М	TATTTTTATGTTTTTTATTTTGC GG
		Обратный-М	TCAAGGGAACGAGTATATCTAAAC
		Прямой-U	TATTTTTATGTTTTTTATTTTGTGG
		Обратный-U	TTAAGGGAATGAGTATATTTAAAT
	2	Прямой-М	TATAATAAGGGTAAGTGAAAGTCGT
		Обратный-М	TCAAGGGAACGAGTATATCTAAAC
		Прямой-U	TATAATAAGGGTAAGTGAAAGTTGT
		Обратный-U	TTAAGGGAATGAGTATATTTAAAT
	3	Прямой-М	TTTAGAGGGGAGGTGAATAGGCGA
		Обратный-М	TCAAGGGAACGAGTATATCTAAAC
		Прямой-U	TTTAGAGGGGAGGTGAATAGGTGA
		Обратный-U	TTAAGGGAATGAGTATATTTAAAT
<i>ZmSDH4</i>	1	Прямой-М	GATGTTTTTTCGTCTGATTTATTTTC
		Обратный-М	GTATTAGGCGGTTTTAGAGAAGG
		Прямой-U	TGTTTTTTGTTGTATTATTTTGA
		Обратный-U	GTATTAGGCGGTTTTAGAGAAGG
	2	Прямой-М	TTTTAAAGTTTTTATTTTTTTCGA
		Обратный-М	GTATTAGGCGGTTTTAGAGAAGG
		Прямой-U	TTTTAAAGTTTTTATTTTTTTTGA
		Обратный-U	GTATTAGGCGGTTTTAGAGAAGG
	3	Прямой-М	AAATTAGATTTAATTAATTTTCGT
		Обратный-М	GTATTAGGCGGTTTTAGAGAAGG
		Прямой-U	AAATTAGATTTAATTAATTTTGT
		Обратный-U	GTATTAGGCGGTTTTAGAGAAGG