

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*)

О. А. Землянухина*, Н. Н. Черкасова*, Т. П. Жужжалова*, В. Н. Калаев**

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы
и сахара им. А.Л. Мазлумова»

**ФГБОУ ВО «ВГУ»

Поступила в редакцию 6.03.2017 г.

Аннотация. Получены кислотоустойчивые растения-регенеранты сахарной свёклы в результате отбора на селективных средах с сублетальной кислотностью при pH 3.5 при трёхкратном пассировании. При адаптации микроклонов сахарной свеклы двух генотипов к условиям низкого pH происходят достоверные изменения в метаболизме клетки: активация или ингибирование ферментов ЦТК, пентозо-фосфатного и глиоксилатного циклов, а также ферментов окислительного стресса. Так, увеличиваются активности пероксидазы и изоцитратлиазы у обеих форм, при этом в компонентах гибрида уменьшается активность NADH-дегидрогеназы. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы увеличивается у мужкостерильной формы, но уменьшается у фертильных растений. Процесс адаптации к пониженному pH сопровождается изменением изоферментных спектров пероксидазы, 1- и 2-эстеразы, цитохром-с-оксидазы, малик энзима. Процесс адаптации у регенерантов сахарной свеклы сопровождается увеличением синтеза белка, а уровень метаболического отклика на стресс в значительной степени зависит от исходного генотипа.

Ключевые слова: *Beta vulgaris L.*, сахарная свекла, индуцированная кислотоустойчивость, активность ферментов, изоферменты

Abstract. Selection on selective media with sublethal acidity at pH 3.5 and thrice-repeated passaging allows obtaining acid-resistant plants-regenerants of sugar beet. Among mechanisms of plant adaptation to stress factors of different origin are the similar changes in gene expression leading to increase or decrease in activity of several enzymes of main cell cycles and total protein, and to change of isozyme spectrum. In this connection, the direction of biochemical investigations studying an adaptive potential of sugar beet acid-resistant plants-regenerants is urgent. Aim the given investigation was to study metabolite profile and morphological traits of plants-regenerants adapted to the influence of aluminum ions. Objectives of the investigation were to obtain acid-resistant plants, and to study development of leaf apparatus and root system, enzyme activity, content of soluble protein and isozyme spectrum of several key enzymes of plant cell. When sugar beet microclones of two components of the hybrid Vityaz are adapted to conditions of low pH, certain changes in cell metabolism take place, i.e. activation or inhibition of enzymes of tricarboxylic acid cycle, pentose-phosphate and glyoxylate cycles, as well as enzymes of oxidation stress. Thus, peroxidase and isocitrate lyase activity increases in both forms, and NADH-dehydrogenase activity in the hybrid components decreases. Activity of glucose-6-phosphate-dehydrogenase increases in the male sterile (MS) form, but becomes lower in the Ramonskaya fertile (RF) one. Process of adaptation to lowered pH is accompanied by change of isozyme spectra of peroxidase, 1- and 2-esterase, cytochrome-c-oxidase, malic enzyme. Process of adaptation in sugar beet regenerants is accompanied by increase of protein synthesis, and level of metabolic response to stress substantially depends on initial genotype of hybrid component.

Key words: *Beta vulgaris L.*, sugar beet, induced acid resistance, enzyme activity, isozymes

Сахарная свёкла очень требовательна к условиям произрастания. Большие урожаи её можно получить только на высокоплодородных почвах

с реакцией почвенного раствора, близкой к нейтральной, при достаточно высокой обеспеченности элементами минерального питания. Длительное применение минеральных удобрений приводит к глубоким изменениям физико-химических свойств даже высокобуферных чернозём-

© Землянухина О. А., Черкасова Н. Н., Жужжалова Т. П., Калаев В. Н., 2017

мов. Это часто вызывает повышение кислотности почв и губительно сказывается на растениях [1].

Использование селективной системы *in vitro* является перспективным и экологически безопасным направлением создания новых форм и сортов растений в силу повышенной чувствительности изолированных тканей к стрессам, приводящей к резкому возрастанию уровня наследственной изменчивости растений [2, 3].

Моделирование абиотических воздействий (селективные агенты) на органы и ткани в условиях *in vitro* позволяет создавать растения с устойчивостью к кислой среде [4, 5, 6]. Большое значение имеет использование морфобиологических, биохимических и других признаков, способствующих более эффективному отбору. К механизмам адаптации растений к стрессовым факторам различного происхождения относятся сходные изменения в экспрессии генов, которые приводят к повышению или снижению активности целого ряда ферментов основных циклов клетки, общего белка, изменению изоферментного спектра.

В связи с этим направление биохимических исследований по изучению адаптивного потенциала кислотоустойчивых растений-регенерантов сахарной свёклы является актуальным и перспективным.

Целью данного исследования являлось изучение биохимических реакций и морфологических признаков растений-регенерантов, адаптированных к воздействию ионов алюминия.

Задачами исследования было получение кислотоустойчивых растений сахарной свёклы, изучение развития листового аппарата и корневой системы, ферментативной активности, содержания растворимого белка и изоферментного спектра ряда ключевых энзимов растительной клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материалов использовали компоненты гибрида сахарной свёклы рамонской селекции: линия с цитоплазматической мужской стерильностью 2093МС, фертильная линия гетерозисного опылителя 2093РФ и кислотоустойчивые линии КУ 2093 МС, КУ 2093РФ сахарной свёклы, полученные в культуре *in vitro*.

Для моделирования кислотности питательной среды в условиях *in vitro* использовали соль $AlCl_3$ в концентрациях 0.02% и 0.05%, что создает pH 3.8 и 3.5. Отбор кислотоустойчивых регенерантов проводили в течение 3 пассажей соответственно (контроль pH 5.8):

- 1 пассаж: проращение семян при pH 3.5;
- 2 пассаж: отбор полученных проростков при pH 3.5;
- 3 пассаж: отбор при корнеобразовании при pH 3.8.

Уровень устойчивости оценивали в 3 пассаже по величине индекса длины корня (ИДК), равном отношению длины корня в опыте к средней длине корня в контроле [7].

Культивирование растений осуществлялось при температуре 23-26 °С, 16-часовом фотопериоде с освещенностью 5000 люкс и относительной влажности воздуха 70% [8]. Перед проведением биохимических анализов опытные и контрольные регенеранты культивировали на контрольной среде при pH 5.8 в течение года.

Для получения ферментативных препаратов растения сахарной свёклы растирали со стеклянным песком в 0.1 М трис-НС1-буфере, pH 7.5 и центрифугировали в эппендорфах в течение 7 минут при 4200 g, 4 °С, на центрифуге CM50 ELMi (Латвия). Надосадочные жидкости в процессе работы сохраняли в твердотельном термостате BIOSAN CH-100 (Латвия) при -3 °С. Анализировали следующие ферменты: глюкозо-6-Ф-дегидрогеназа (гл.-6-Ф-ДГ; КФ 1.1.1.49), пероксидаза (ПО; КФ 1.11.7), изоцитратлиаза (ИЦЛ; КФ 4.1.3.1), изоцитратдегидрогеназа (ИДГ; КФ 1.1.1.42), малатдегидрогеназа (NADH-МДГ; КФ 1.1.1.37), малик-энзим (NAD-МЭ; КФ 1.1.1.39), NADH-дегидрогеназа (NADH-ДГ; 1.6.99.1) [9]. Расчет относительной общей активности проводили путем отнесения изменения оптической плотности к единице времени (мин) в 1 мл ферментного препарата с учетом коэффициента молярной экстинкции (именуется в дальнейшем «общая активность», ФЕ/мл). Удельную активность рассчитывали, относя общую активность к содержанию белка в 1 мл ферментного препарата (ФЕ/мг). Измерения проводили на спектрофотометре UNICO 2800 (США).

Анализ изоферментного спектра проводили в вертикальных пластинах в 7.5% ПААГ по стандартному методу Дэвиса. Электрофорез осуществляли с выявлением изоформ ферментов пероксидазы, 1- и 2-эстеразы, цитохром-с-оксидазы, NADPH-дегидрогеназы, малатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы [10, 11].

Определение содержания растворимого белка в семенах проводили по методу Bradford, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Sigma).

В работе приведены средние результаты опытов, проведенных в пяти биологических повторностях. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ "Stadia". Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Кулаичева [12]. Сравнивали достоверность различий активностей (ФЕ) и удельных активностей (ФЕ/мг) между опытными и контрольными образцами, между двумя генотипами с использованием X-критерия рангов Ван-дер-Вардена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При первичном отборе на этапе прорастания семян в селективной среде с сублетальной кислотностью (рН 3.5) выживаемость проростков составила около 50%. Культивирование отобранных проростков в тех же условиях повысило кислотоустойчивость регенерантов до 80%. Дальнейшее

культивирование регенерантов на корневой среде при рН 3.8 дало возможность через 4 недели выделить устойчивые микроклоны по индексу длины корня (рисунок). Созданные линии имели хорошо развитую корневую систему, где 58.5-67.0 % регенерантов имели длину корня от 3.3 до 5.7 см. Показатель прироста длины корня устойчивых регенерантов варьировал от 1.0 до 1.1 в зависимости от генотипа (табл. 1).

Морфологическая оценка микроклонов показала их активный рост и развитие в селективных условиях, что сопровождалось образованием нормальных черешковых листьев с цельной пластинкой, тупой верхушкой и клиновидным основанием, сбегающим по черешку. Наибольшую ширину лист имел в середине пластинки, проявлялась гофрированность листа. Цвет листовых пластинок зелёный. Прирост высоты растений варьировал от 1.0 до 2.74 см, что соответствовало 42.9-57.2 % от



Рис. 1. Этапы отбора кислотоустойчивых растений-регенерантов в селективных условиях. Обозначения: I пассаж. Первичный отбор в период прорастания семян: слева – гибель проростка; справа – нормальное развитие; II пассаж. Вторичный отбор регенерантов: слева – гибель регенеранта; справа – нормальное развитие; III пассаж: Третичный отбор микроклонов при корнеобразовании: слева – гибель контрольного регенеранта; справа – кислотоустойчивое растение с корнями.

Таблица 1.

Влияние кислотности среды на развитие корневой системы и рост контрольных и устойчивых микроклонов сахарной свеклы

Генотип	Прирост высоты растений, %	Длина корня, см	Индекс длины корня
2093МС (рН 5.8, контроль)	60.1± 4.10	5.6±0.85	1.0
КУ 2093МС (рН 3.8, опыт)	57.2±5.00	5.7±1.65	
2093РФ (рН 5.8, контроль)	52.3± 5.10	3.0±0.50	1.1
КУ 2093РФ (рН 3.8, опыт)	42.9±6.40	3.3±0.85	

начальной высоты. Таким образом, были созданы кислотоустойчивые линии сахарной свёклы.

Согласно литературным данным, в селективных условиях происходит усиление процессов метаболизма, повышающее общую биохимическую активность растений в условиях стресса [13]. Одной из первых реакций растения на стресс является активация антиоксидантной системы в силу повышенного синтеза активных метаболитов кислорода.

Экспериментальные исследования показали, что у регенерантов сахарной свеклы, адаптированных

к условиям жесткого снижения pH (3.5) и перенесенных в контрольные условия, даже через год культивирования определяется увеличение удельной активности пероксидазы в 3 раза у опытных вариантов КУ 2093МС по сравнению с контрольными 2093МС (различия достоверны (P<0.01)). У линии 2093РФ это увеличение составляет 1.2 раза. Начальная активность фермента у контрольной формы РФ достоверно (P<0.01) превышала показатели линии МС в 3 раза (табл. 2). Изоферментный спектр ПО у контрольных и опытных вариантов также имеет отличия (табл. 3).

Таблица 2.

Общая и удельная активности ферментов в контрольных и кислотоустойчивых формах сахарной свеклы

Образец		МС, контроль	РФ, контроль	МС, опыт	МС, опыт
Пероксидаза	ФЕ/мл	2.36 ± 0.32	3.48 ± 0.35а	7.92 ± 0.71**	8.03 ± 0.77**
	ФЕ/мг	3.83 ± 0.68	11.55 ± 2.40	11.57 ± 1.13**	13.61 ± 1.40
NADH-дегидрогеназа	ФЕ/мл × 10 ⁻³	7.68 ± 0.40	7.87 ± 0.58	7.58 ± 0.66	6.24 ± 0.84
	ФЕ/мг × 10 ⁻³	11.25 ± 0.92	14.58 ± 1.75а	9.51 ± 0.72*	8.86 ± 1.01**
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	ФЕ/мл × 10 ⁻³	22.66 ± 2.70	23.62 ± 0.76	28.61 ± 2.46*	24.1 ± 2.82
	ФЕ/мг × 10 ⁻³	35.43 ± 3.04	75.37 ± 11.09	41.65 ± 3.61*	41.04 ± 4.80*
Изоцитратлиаза	ФЕ/мл × 10 ⁻³	2.92 ± 0.74	3.89 ± 0.50	5.4 ± 0.33**	6.55 ± 1.88
	ФЕ/мг × 10 ⁻³	5.86 ± 1.53	11.63 ± 2.33в	9.95 ± 0.35*	17.09 ± 4.63в
Изоцитратдегидрогеназа	ФЕ/мл × 10 ⁻³	30.82 ± 1.22	33.12 ± 2.76	37.63 ± 0.47**	31.01 ± 0.86
	ФЕ/мг × 10 ⁻³	68.03 ± 8.86	87.37 ± 7.81а	69.91 ± 2.70	82.64 ± 7.94
Малатдегидрогеназа	ФЕ/мл × 10 ⁻³	25.34 ± 1.59	29.95 ± 0.53а	25.06 ± 1.37	28.42 ± 0.55*в
	ФЕ/мг × 10 ⁻³	36.56 ± 2.14	55.74 ± 6.03б	31.99 ± 3.25	41.54 ± 3.29*в
Малик-энзим	ФЕ/мл × 10 ⁻³	12.96 ± 0.30	9.98 ± 0.55б	14.5 ± 0.46*	12.96 ± 0.33**г
	ФЕ/мг × 10 ⁻³	18.70 ± 0.27	18.14 ± 0.86	18.28 ± 0.82	18.92 ± 1.35

Примечания: * - различия с контролем достоверны (P<0.05); ** - различия с контролем достоверны (P<0.01); а – различия в контроле с МС достоверны (P<0.05); б – различия в контроле с МС достоверны (P<0.01); в - различия в опыте и в контроле с МС достоверны (P<0.05); г - различия в опыте с МС достоверны (P<0.05).

Таблица 3.

Изоферментные спектры пероксидазы и эстеразы в контрольных и кислотоустойчивых растениях сахарной свеклы *in vitro*

Относительная электрофоретическая подвижность, R _f	Пероксидаза				Эстераза			
	2093 МС	2093 РФ	КУ2093 МС	КУ2093 РФ	2093 МС	2093 РФ	КУ2093 МС	КУ2093 РФ
0.098	-	-	-	-	+	-	+	-
0.116	-	-	-	-	-	+	-	+
0.125	-	+	-	+	-	-	-	-
0.164 и 0.207, следы	-	-	-	-	+	-	+	-
0.243	+	+	+	+	-	-	-	-
0.288	-	-	+	+	-	-	-	-
0.561	-	-	-	-	-	-	+	-
0.593	+	-	-	+	-	-	-	-
0.658	-	-	-	-	+	+	+	+
0.663	+	+	+	+	-	-	-	-
0.677	+	+	+	+	-	-	-	-
0.681	+	+	+	+	-	-	-	-
0.707	-	-	-	-	+	+	+	+
0.725	+	+	+	+	-	-	-	-

† наличие зоны активности; - отсутствие зоны активности фермента

В анодной (верхней) части геля у отселектированных растений МС-формы появляется дополнительная зона активности с R_f 0.228, отсутствующая у контрольных растений, а в катодной части исчезает полоса фермента с R_f 0.593. Для адаптированных растений РФ-формы характерно появление зоны с R_f 0.228 и 0.593.

Если активность ПО повышается с приобретением индуцированных изменений, то активность митохондриальной NADH-дегидрогеназы (Ca^{2+} -зависимой), наоборот, снижается, что согласуется с представлениями о противоположном функционировании двух ферментов [14, 15, с. 152]. Статистическая обработка результатов показывает снижение активности дегидрогеназы в 1.2 раза у МС-формы (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)) и в 1.6 раза у РФ-формы (различия с контролем достоверны ($P < 0.01$)). Начальная удельная активность фермента у РФ-формы достоверно ($P < 0.05$) была выше таковой у МС-формы в 1.3 раза. Изоферментный спектр NADH-дегидрогеназы представлен у всех растений одной зоной активности с R_f 0.366.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, являющаяся ключевым ферментом окислительной ветви пентозо-фосфатного цикла, индикативна по отношению к неблагоприятным факторам среды [16]. Было показано, что приобретение адаптивных признаков сопровождается небольшим увеличением активности фермента у МС-формы (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)). Однако у РФ-формы, наоборот, происходит уменьшение удельной активности в 1.8 раза (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)). Активность фермента, как в опыте, так и в контроле между МС и РФ не отличалась.

В настоящее время показано, что изоцитратлиаза функционирует не только в глиоксилатном цикле при прорастании семян. По мере старения растений активируется цитоплазматическая форма ИЦЛ, оптимум ее действия наблюдается при более низком значении pH (6.5) и зависит от присутствия ионов Mn^{2+} [17]. В условиях *in vitro* происходят процессы онтогенетического взросления, что и объясняет, по нашему мнению, увеличение активности фермента. Удельная активность изоцитратлиазы, фермента глиоксилатного цикла, достоверно увеличивалась у МС-формы в 1.7 раза, а у РФ линий – в 1.5 раза (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)). Активность ИЦЛ у контрольных растений РФ-формы почти в 2 раза превышает активность растений МС линий (различия достоверны ($P < 0.05$)).

Что же касается другого фермента, «работающего» на том же субстрате – изоцитратдегидрогеназы, то изменения в его функционировании были незначительными. Так, опытные растения МС-формы показывали активность ИДГ в 1.2 раза выше контрольной (различия с контролем достоверны ($P < 0.01$)), а у растений РФ-формы активность фермента не изменялась. Значения показателя у РФ-формы превышают активность фермента у МС-формы в 1.2 раза (различия достоверны (различия достоверны ($P < 0.05$))).

Результаты измерения активности двух из четырех ферментов малатдегидрогеназного комплекса растений – NADH-зависимой малатдегидрогеназы и NAD-зависимого малик-энзима показали разницу в их действии. Так, если для МДГ отмечалось достоверное снижение активности фермента у КУ 2093РФ по сравнению с контролем ($P < 0.05$), то у МС формы уровень активности в опытных и контрольных растениях был примерно одинаков. При этом у РФ-формы активность МДГ по сравнению с МС-формой была выше, как в контроле, так и в опыте: в 1.5 раза (различия достоверны ($P < 0.01$)) и в 1.3 раза (различия достоверны ($P < 0.05$)), соответственно. Удельная активность малик-энзима была постоянной как у формы МС, так и формы РФ, как в опытных, так и в контрольных вариантах. На электрофореграммах МЭ у опытных МС-растений выявляется зона активности фермента с R_f 0.097 и исчезает с R_f 0.673. Для РФ-форм адаптация не связана с изменением изоферментного спектра малик-энзима.

Проведение изоферментного анализа на выявление активности цитохром-*c*-оксидазы показало, что опытные растения МС-формы обнаруживают дополнительную зону с R_f 0.631, а опытные растения формы РФ отличаются исчезновением зон с R_f 0.119 и с R_f 0.663 с одновременным появлением активности в зоне R_f 0.569.

Распределение изоферментного состава 1- и 2-эстеразы выявило отличия в контрольных и опытных растениях сахарной свеклы (табл. 3). У опытных МС-растений появляется новая четкая зона фермента с R_f 0.561, для растений линии РФ таких изменений не наблюдается.

Приспособление к пониженному pH среды вызвало увеличение содержания количества растворимого белка клетки как у МС, так и у РФ-формы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Растения в значительной степени подвержены действию стресса в силу прикрепленности к ме-

сту произрастания, но это же делает их удобным объектом для исследования влияния неблагоприятных факторов внешней среды. Понимание процессов, происходящих в растениях, с помощью которых они противостоят субоптимальным факторам внешних воздействий, позволяет регулировать их рост и развитие.

Определить первичную мишень действия неблагоприятного фактора очень трудно, но известно, что в первую очередь под действием стресса практически любой природы (повышение температуры, засуха, засоление и др.) увеличивается образование активных форм кислорода [18]. Фермент пероксидаза является стрессорным: чем больше синтезируется в клетках активных форм кислорода, тем выше активность фермента, разрушающего пероксид водорода и ограничивающего свободнорадикальные процессы. Кислотоустойчивые растения показали достоверное увеличение активности ПО от 2.4 до 3.4 раза по сравнению с контрольными, как у формы МС, так и формы РФ. Так как начальный уровень удельной активности у растений формы РФ выше, чем у растений формы МС в 3 раза, можно заключить, что влияние снижения рН оказывает большее воздействие на генотип МС. Под влиянием кислотного стресса изменяется изоферментный спектр энзима, появляются новые (МС, РФ) или исчезают отдельные (МС) зоны активности. Изменение активности фермента и количества его молекулярных форм является одним из механизмов устойчивости к стрессу, вызванному снижением рН среды.

Митохондрии принимают непосредственное участие в ответе растений на стресс за счет некоторых факторов, регулирующих разобщение окисления и фосфорилирования. Совокупность молекулярных механизмов, позволяющих поддерживать внутриклеточную концентрацию кислорода на низком уровне, называемую свободным окислением, позволяет снижать образование активных форм кислорода митохондриями при стрессах различного происхождения. Одним из таких механизмов является работа фермента NADH-дегидрогеназы (Ca^{2+} -зависимой). В настоящее время считается, что на наружной мембране митохондрий функционируют два фермента NADH-дегидрогеназы, имеющих разную чувствительность к ингибиторам [19, 20]. В нашей работе, по всей видимости, мы имеем дело с суммарной активностью этих двух форм фермента. Результаты показали, что активность фермента

достоверно снижается в 1.2 у КУ 2093МС и 1.6 раза у КУ 2093РФ форм по сравнению с контролем. Поскольку процесс окисления NADH связан с выделением части ассимилированного CO_2 , вероятно, это может быть связано с генной регуляцией активности фермента путем метилирования ДНК [21, 22]. Снижение (ингибирование) активности NADH-дегидрогеназы в данном случае может приводить, например, к повышению синтеза белка, что и наблюдается в наших исследованиях. Происходит небольшое, примерно в 1.4 раза, увеличение количества белка у кислотоустойчивых растений РФ-формы и в 1.1 раза – у МС-растений. Снижение активности фермента идет параллельно с увеличением активности пероксидазы, т.е. действие двух ферментов противоположно.

Сахарная свекла относится к активно накапливающим оксалоацетат растениям. В этом процессе главенствующая роль принадлежит ферменту изоцитратлиаза, участвующему в реакциях синтеза серина, глицина, оксалоацетата у высших растений [22, 23]. Ранее нами было обнаружено [25], что в условиях недостатка влаги, вызванной добавлением в питательные среды сорбита, происходит увеличение активности фермента до 2 раз, при этом более чем в 8 раз уменьшается K_m (константа Михаэлиса). Влияние подкисления среды, вероятно, протекает по примерно такому же механизму действия на активность изоцитратлиазы: удельная активность фермента у МС-формы увеличивается у кислотоустойчивых растений в 1.7 раза, а у растений РФ-формы – в 1.5 раза. Фермент изоцитратдегидрогеназа не чувствителен к кислотному стрессу.

Пентозофосфатный путь, ключевым ферментом окислительной стадии которого является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, отвечает, с одной стороны, за биосинтез жирных кислот организма, с другой, – за адаптивные характеристики растения [16]. Ранее нами было показано [26], что при адаптации к засолению и водному дефициту у опытных растений активность фермента увеличивается в 1,5 раза с одновременным уменьшением K_m с 0.15 до 0.12 mM у всех компонентов гибрида сахарной свеклы. Настоящие результаты показали, что если у кислотоустойчивых растений формы МС активность фермента увеличивается примерно в 1.2 раза, то у РФ-растений, наоборот, она уменьшается в 1.8 раза. Скорее всего, это свидетельствует о различном адаптивном отклике генотипов растений МС и РФ на стрессовый фактор, так как начальная удельная активность фермента

у них была одинакова. Можно предположить, что адаптация к пониженному рН может происходить у данного фермента иным способом, чем при соле- и засухоустойчивости.

Токсическое действие ионов алюминия вызывает выделение корнями органических кислот: цитрата, оксалоацетата, малата и др. Так, было показано, что секреция малата и оксалата у свеклы при алюминиевом стрессе наблюдается уже через 15-30 мин экспозиции, после чего, в течение 10 часов, она постепенно снижается. Предполагается, что органические кислоты хелатируют ионы алюминия, тем самым приводя к детоксикации [2]. Мы исследовали алюмоустойчивые растения, прошедшие трехкратное культивирование при жестко пониженном рН с последующим переводом в нормальные условия, поэтому постоянство или снижение активности как МДГ, так и МЭ может объясняться выработкой стойкой индуцированной толерантности растений к алюминиевому стрессу.

Изучение изоферментного спектра цитохром-с-оксидазы было выполнено с целью дополнительной характеристики реакций приспособления к снижению рН среды. Данный фермент является отдельным звеном дыхательного метаболизма клетки и вносит существенный вклад в образование макроэргических соединений (помимо фотосинтеза) за счет митохондриального дыхания. Результаты, представленные в настоящей статье, показывают изменения в изоферментном спектре при рН-стрессе как у кислотоустойчивых растений МС-, так и РФ-формы.

Фермент эстераза является лизосомальным ферментом цитоплазмы клеток. Изоферментный анализ неспецифической эстеразы используют для определения сортов, гибридов, уточнения классификации и т.д. [10]. Наши результаты по изучению спектров кислых и щелочных эстераз обнаруживают не только разницу между кислотоустойчивыми и контрольными растениями, но и между количеством и расположением изоформ у МС- и РФ-растениями.

Интересы ученых уже длительное время связаны с исследованием растений, подвергшихся влиянию ухудшения экологических условий в результате антропогенного воздействия. Это объясняется, в частности, практическими задачами получения сортов сахарной свеклы, которые могут расти на обедненных, подкисленных, засоленных и других типах почв с сохранением высокой урожайности. Системы комплекса защитных реакций

растительного организма являются способом поддержания гомеостаза при действии неблагоприятных факторов и лежат в основе экологической устойчивости растений. Нами показано, что действие кислой среды приводит у клеточных линий растений сахарной свеклы к активации или ингибированию синтеза ферментов целого ряда метаболических циклов: ЦТК, пентозо-фосфатного, ферментов окислительного стресса – пероксидазы и NADH-дегидрогеназы, а также цитоплазматической изоцитратлиазы. В процессе адаптации к кислотному стрессу наблюдается увеличение синтеза белка, а величина метаболического отклика полученных растений в значительной степени зависит от исходного генотипа. Эти процессы могут объясняться активацией генов устойчивости, одни из которых экспрессируются в начале стресса, другие – на более поздних стадиях, что приводит к синтезу дополнительных буферных белков, участвующих в устранении токсических метаболитов. Под влиянием различных внешних неблагоприятных воздействий происходит комплексное увеличение вязкости цитоплазмы, изменение соотношения в жирнокислотном составе мембран, изменения также наблюдаются в энергетике, росте, реакциях синтеза и распада. Наиболее заметным симптомом токсичности алюминия является торможение роста корневой системы. Считается, что физиологическим аспектом алюмоустойчивости растений является выделение корнями хелатированных органическими кислотами ионов алюминия [2, 7]. Поставщиками кислот являются метаболические циклы, в частности, гликоксилатный и цикл трикарбоновых кислот, для усиленного функционирования которых требуется повышение интенсивности фотосинтеза. Поэтому, чем устойчивее растение, тем больше у него интенсивность роста корней (по сравнению с контролем) и тем выше фотосинтетическая активность.

Анализ биохимических процессов растений-регенерантов сахарной свеклы с повышенной кислотоустойчивостью показывает, что растительные клетки способны регулировать рН цитозоля путем изменения активности целого ряда ферментов.

Использование культивирования изолированных тканей сахарной свеклы, обусловленное их повышенной чувствительностью к стрессорным факторам и резкому увеличению наследственной изменчивости, позволяет ускорить темпы селекции по созданию устойчивых форм данной культуры для создания высокоурожайных гибридов нового поколения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uexküll H.R. von Global Extent, Development and Economic Impact of Acid Soils / H.R. von Uexküll, E. Mutert // *Plant Soil*. — 1995. — V. 171, № 1. — P. 1-15.
2. Gupta N. Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants: A Review / N. Gupta, G.S. Singh, A. Kumar // *American Journal of Plant Sciences*. — 2013. — V. 4. — P. 21-37.
3. Гладков Е.А. Биотехнологические методы получения растений полевицы побегоносной *Agrostisstolonifera*, обладающих устойчивостью к кадмию и свинцу / Е.А. Гладков // *Сельскохозяйственная биология*. — 2008. — № 3. — С. 83-87.
4. Sakano K. Revision of biochemical pH-stat: involvement of alternative pathway metabolism / K. Sakano // *Plant Cell Physiol*. — 1998. — V. 39, №. 5. — P. 467-473.
5. Vitorello V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants / V.A. Vitorello, F.R.C. Capaldi, V.A. Stefanuto // *Brazilian Journal of Plant Physiology*. — 2005. — V. 17, №. 1. — P. 129-143.
6. Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П. Получение осмоустойчивых растений сахарной свёклы в культуре *in vitro* / Н.Н. Черкасова, Т.П. Жужжалова // *Сахарная свёкла*. — 2001. — №7. — С. 22-24.
7. Косарева И.А. Изучение коллекции сельскохозяйственных культур и диких родичей по признакам устойчивости к токсическим элементам кислых почв / И.А. Косарева // *Доклады РАСХН*. — 2012. — Т. 170. — С. 35-45.
8. Знаменская В.В. Микрклональное размножение сахарной свёклы: методические рекомендации / В.В. Знаменская, Т.П. Жужжалова. — Воронеж, 1995. — 23 с.
9. Землянухин А.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений / А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин. — Воронеж: Изд-во Воронеж.ун-та, 1996. — 188 с.
10. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений / Е.В. Левитес. — Новосибирск: Наука, 1986. — 145 с.
11. Wendel J.F. Visualization and interpretation of plant isozymes / J.F. Wendel, N.F. Weeden // *Isozymes in plant biology*: eds. D. E. Soltis, and P. S. Soltis. — Portland : Dioscorides Press, 1989. — P. 5-45.
12. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных / А.П. Кулаичев. — М.: ФОРУМ: ИНФА, 2006. — 512 с.
13. Hede A.R. Acid soils and aluminum toxicity / A.R. Hede, B. Skovmand, J. Lopez-Cesati // *Application of Physiology in Wheat Breeding*. — Mexico: СММУТ. 2001. — P. 172-182.
14. Землянухина О.А. Влияние различных географических зон произрастания на метаболические параметры сахарной свёклы сорта РМС-120 / О.А. Землянухина, Л.Н. Путилина, И.И. Барте-нев, Т.П. Жужжалова // *Сборник научных трудов ФГБНУ ВНИСС*. — Воронеж, 2014. — С. 40-44.
15. Тютюрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнестойчивости растений / С.Л. Тютюрев. — СПб.: RIZO-печать, 2002. — 328 с.
16. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений: учебное пособие студентов биологических вузов / Т.В. Чиркова. — СПб.: СПбГУ, 2002. — 244 с.
17. Eprintsev A.T. Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. / A.T. Eprintsev, D.N. Fedorin, A.V. Salnikov, A.U. Igamberdiev // *J. Plant Physiol*. — 2015. — V. 181. — P. 1-8.
18. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие / О.Г. Полесская. — М.: КДУ, 2007. — 140 с.
19. Rasmusson A.G. Alternative NAD(P) H dehydrogenases of plant mitochondria / A.G. Rasmusson, K.L. Soole, T.E. Elthon // *Annu. Rev. Plant Biol*. — 2004. — V. 55. — P. 23-39.
20. Rasmusson A.G. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria / A.G. Rasmusson, D.A. Geisler, I.M. Møller // *Mitochondrion*. — 2008. — V. 8. — P. 47-60.
21. Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра / Б.Ф. Ванюшин // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. — 2013. — Т. 17, № 4/2. — С. 805-832.
22. Землянухин А.А. Метаболизм органических кислот растений / А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин. — Воронеж: ВГУ. 1995. — 152 с.
23. Igamberdiev A.U. Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants / A.U. Igamberdiev, Eprintsev A.T. // *Frontiers in Plant Science*. — 2016. — V. 7. — P. 1-15.
24. Оценка оксидативного статуса растений, произрастающих в различных условиях / М.Г. Хол-лявка [и др.] // *Фундаментальные исследования*. — 2014. — № 8, ч. 5. — С. 891-897.
25. Землянухина О.А. Метаболическая адаптация растений сахарной свёклы *in vitro* к условиям водного дефицита / О.А. Землянухина, Н.Н. Черкасова, Т.П. Жужжалова // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов*. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2009. — Вып. 11. — С. 96-102.

26. Землянухина О.А. Адаптация сахарной свеклы *in vitro* к условиям засоления / О.А. Землянухина, Н.Н. Черкасова, Т.П. Жужжалова // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2008. — Вып. 10. — С. 219-225.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им.А.Л.Мазлумова»

Землянухина О. А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биотехнологии.

Тел.: +7 905 050-95-02.

E-mail: oz54@mail.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution "The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar"

Zemlianukhina O. A., Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Department of biotechnology

Ph.: +7 905 050-95-02

E-mail: oz54@mail.ru

Черкасова Н. Н., старший научный сотрудник отдела биотехнологии

Тел.: +7 952 540-37-56

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Cherkasova N. N., Senior Researcher Officer of, Department of biotechnology

Ph.: +7 952 540-37-56.

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Жужжалова Т. П., профессор, доктор биологических наук, заведующая отделом биотехнологии, главный научный сотрудник

Тел.: +7 961 182-13-54

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Zhuzhhalova T. P., Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Professor of the Department of biotechnology

Ph.: +7 961 182-13-54

E-mail: biotechnologiya@mail.ru,

Воронежский государственный университет
Калаев В. Н., доктор биологических наук, профессор кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

Тел.: +7 910 345-00-72

E-mail: dr_huixs@mail.ru

Voronezh State University.
Kalaev V. N., PhD (Biology), DSci. (Biology), Full Professor, dept. of Genetics, Cytology and Bioengineering

Ph.: +7 910 345-00-72

E-mail: dr_huixs@mail.ru