

ISSN 1997-1389 (Print)  
ISSN 2313-5530 (Online)

**Журнал Сибирского  
федерального университета  
Биология**

**Journal of Siberian  
Federal University  
Biology**

**2020 13 (2)**

ISSN 1997-1389 (Print)  
ISSN 2313-5530 (Online)

2020 13(2)

# Журнал Сибирского федерального университета Биология

---

## Journal of Siberian Federal University Biology

Издание индексируется Scopus (Elsevier), «Russian Science Citation Index» и «Zoological Record» на платформе «Web of Science» (Clarivate Analytics), Российским индексом научного цитирования (НЭБ), представлено в международных и российских информационных базах: Ulrich's periodicals directory, ProQuest, EBSCO (США), Google Scholar, Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), DOAJ, КиберЛенинка. Включено в список Высшей аттестационной комиссии «Рецензируемые научные издания, входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования».

---

**Журнал Сибирского федерального университета. Биология.**  
**Journal of Siberian Federal University. Biology.**

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Главный редактор: *Е.С.Кравчук*. Редактор *И.А.Вейсиг*. Корректор *С.В.Хазаржан*.  
Компьютерная верстка *Е.В. Гревцовой*

№ 2. 30.06.2020. Индекс: 42325. Тираж: 1000 экз.

Свободная цена

Адрес редакции и издательства: 660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, оф. 32-03.

Отпечатано в типографии Издательства БИК СФУ  
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 82а.

*Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-28725 от 29.06.2007 г.,  
выданное Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций,  
связи и охраны культурного наследия.*

<http://journal.sfu-kras.ru>

Подписано в печать 15.06.2020. Формат 84x108/16. Усл. печ. л. 8,5.  
Уч.-изд. л. 8,0. Бумага тип. Печать офсетная. Тираж 1000 экз. Заказ № 11395.

Возрастная маркировка в соответствии с Федеральным законом № 436-ФЗ: 16+

## CHIEF EDITOR

Michail Gladyshev, Corresponding Member of RAS, Professor, Institute of Biophysics SB RAS, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia.

---

## SCIENCE EDITOR

Elena Kravchuk, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

---

## EDITORIAL BOARD

- Sergey Bartsev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Andrey Degermendzhy, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Nikolay Gaevsky, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Joseph Gitelzon, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Viktor Glupov, Corresponding Member of RAS, Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia
- Malcolm Hughes, University of Arizona, Tucson, USA
- Mikhail Karpinsky, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, Russia
- Valentina Kratasyuk, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- John Lee, University of Georgia, Athens, USA
- Elena Muratova, Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Akira Osawa, Kyoto University, Kyoto, Japan
- Vitaliy Semenchenko, Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus
- Nadezhda Sushchik, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Sabu Thomas, Mahatma Gandhi University, Kottayam, India
- Aristidis Tsatsakis, University of Crete, Heraklion, Greece
- Eugene Vaganov, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Tatiana Volova, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Egor Zadereev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

## CONTENTS

**Natalya I. Grabovskaya and Olga N. Babenko**

Protective Effect of Preparations Containing Brassinosteroids on Plants Exposed to Environmental Lead Contamination: a Review.....129

**Alexander V. Babosha**

Effect of Abscisic Acid on the Susceptibility of Wheat Leaves to Powdery Mildew *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* .....164

**Guzel R. Kudoyarova, Lidiya B. Vysotskaya, Arina V. Feoktistova, Igor I. Ivanov, Denis U. Zaitzev and Guzel R. Akhiyarova**

Effect of Phosphate Deficit on Root Growth, Production of Reactive Oxygen Species and Hormone Content in Barley Plants.....173

**Ragida M. Taipova, Khalit G. Musin and Bulat R. Kuluev**

*Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Amaranthus cruentus* L. Epicotils.....179

**Yuliyana V. Aleksandrova, Tatiana A. Zotina and Nikolay A. Gaevsky**

Effect of the Level of Irradiance on Growth and Content of Photosynthetic Pigments of Canadian Elodea (*Elodea canadensis*) in Model System "Water-Bottom Sediments" .....188

**Marina V. Fonti, Elena A. Babushkina, Dina F. Zhirnova and Eugene A. Vaganov**

Xylogenesis of Scots Pine in an Uneven-Aged Stand of the Minusinsk Depression (Southern Siberia).....197

**Natalia O. Zhila, Galina S. Kalacheva, Evgeniy G. Kiselev and Tatiana G. Volova**

Synthesis of Polyhydroxyalkanoates from Oleic Acid by *Cupriavidus necator* B-10646.....208

**Eugenia E. Bashmakova, Alexander N. Kudryavtsev and Ludmila A. Frank**

Development of the Method to Produce Functionally Active Recombinant Streptavidin in *Escherichia coli* Cells .....218

## СОДЕРЖАНИЕ

**Н.И. Грабовская, О.Н. Бабенко**

Протекторное действие на растения препаратов, содержащих brassinosteroids,  
в условиях загрязнения среды свинцом (обзор) .....129

**А.В. Бабоша**

Влияние абсцизовой кислоты на восприимчивость листьев пшеницы  
к возбудителю мучнистой росы *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* .....164

**Г.Р. Кудоярова, Л.Б. Высоцкая, А.В. Феоктистова,  
И.И. Иванов, Д.Ю. Зайцев, Г.Р. Ахиярова**

Влияние дефицита фосфора на рост корней, продукцию активных форм кислорода  
и содержание гормонов в растениях ячменя.....173

**Р.М. Таипова, Х.Г. Мусин, Б.Р. Кудуев**

Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей амаранта багряного  
*Amaranthus cruentus* L. ....179

**Ю.В. Александрова, Т.А. Зотина, Н.А. Гаевский**

Влияние светового фактора на рост и содержание фотосинтетических пигментов  
элодеи канадской (*Elodea canadensis*) в модельной системе «вода-донные отложения» .....188

**М.В. Фонти, Е.А. Бабушкина, Д.Ф. Жирнова, Е.А. Ваганов**

Особенности ксилогенеза сосны обыкновенной в разновозрастном древостое  
Минусинской котловины (Южная Сибирь) .....197

**Н.О. Жила, Г.С. Калачева, Е.Г. Киселев, Т.Г. Волова**

Синтез полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 при росте  
на олеиновой кислоте ..... 208

**Е.Е. Башмакова, А.Н. Кудрявцев, Л.А. Франк**

Разработка способа получения функционально активного  
рекомбинантного стрептавидина в клетках *Escherichia coli* .....218

DOI 10.17516/1997-1389-0322

УДК 574.24

## **Protective Effect of Preparations Containing Brassinosteroids on Plants Exposed to Environmental Lead Contamination: a Review**

**Natalya I. Grabovskaya and Olga N. Babenko\***

*Sh. Ualikhanov Kokshetau State University  
Kokshetau, Republic of Kazakhstan*

Received 18.04.2019, received in revised form 10.03.2020, accepted 13.05.2020, published online 27.05.2020

**Abstract.** The review article addresses the potential use of brassinosteroids and synthetic brassinosteroid-based preparations to protect plants exposed to environmental lead contamination. Under climate change and anthropogenic chemical pollution of the biosphere, this stressor is one of the most important agents that reduce the yield and quality of crops, and, therefore, it deserves close attention. Brassinosteroids and brassinosteroid-based preparations are regarded as universal plant growth stimulants and adaptogens. To support this assertion, it is important to study behavior of brassinosteroids under environmental lead contamination and discuss arguments in favor of their preferential use. The article provides information about the history of discovery and study of brassinosteroids, reports data on their chemical nature, biosynthesis, metabolism, and mechanisms of action on the plant cell, and describes interactions of brassinosteroids with other substances that stimulate plant growth and development. The article discusses phytotoxicity of lead and its influence on the growth, development, productivity, and resistance of plants. Literature data and results obtained by the authors provide evidence of the protective effect of brassinosteroids and brassinosteroid-based preparations on plants exposed to lead contamination and suggest reasons for their preferential use in the context of chemical pollution. Arguments are offered in favor of further research of these biostimulants in order to specify their use depending on the characteristics of the stress factor and biological properties of the plant.

**Keywords:** biostimulant, brassinosteroids, environmental pollution, heavy metals, lead, stress factor, Epin-Extra.

---

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: Babenko\_ON@mail.ru

ORCID: 0000-0001-7826-1161 (Grabovskaya N.); 0000-0003-4114-1953 (Babenko O.)

Citation: Grabovskaya N.I., Babenko O.N. Protective effect of preparations containing brassinosteroids on plants exposed to environmental lead contamination: a review. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(2), 129-163. DOI: 10.17516/1997-1389-0322

---

## **Протекторное действие на растения препаратов, содержащих брассиностероиды, в условиях загрязнения среды свинцом (обзор)**

**Н.И. Грабовская, О.Н. Бабенко**  
*Кокшетауский государственный университет  
им. Ш. Уалиханова  
Республика Казахстан, Кокшетау*

**Аннотация.** В обзорной статье освещены вопросы, касающиеся возможности применения брассиностероидов и синтетических препаратов на их основе для защиты растений при загрязнении окружающей среды свинцом. В условиях изменения климата и антропогенного химического загрязнения биосферы данный стрессор является одним из важнейших агентов, снижающих урожайность и качество растениеводческой продукции, и поэтому он заслуживает пристального внимания. Брассиностероиды и препараты на их основе позиционируются как универсальные стимуляторы роста и адаптогены растений, поэтому для подтверждения данного тезиса важно рассмотреть особенности их действия в условиях воздействия названного выше стрессорного фактора с указанием аргументов в пользу их приоритетного использования. В статье приведена информация об истории открытия и изучения брассиностероидов, их химической природе, биосинтезе и метаболизме, механизмах действия на растительную клетку и возникающих при этом физиологических эффектах, а также особенностях взаимодействия брассиностероидов с другими стимулирующими рост и развитие растений веществами. Рассмотрены вопросы фитотоксичности свинца, его влияния на рост, развитие, продуктивность и устойчивость растений. На основе анализа литературных источников и собственных исследований приводятся доказательства протектирующего действия брассиностероидов и препаратов на их основе на растения в условиях свинцового загрязнения среды, аргументируются причины их приоритетного использования в условиях химического загрязнения. Приводятся аргументы в пользу дальнейшего изучения данных биостимуляторов с целью спецификации регламента применения в зависимости от особенностей стрессорного фактора и биологической природы растения.

**Ключевые слова:** биостимулятор, брассиностероиды, загрязнение окружающей среды, тяжелые металлы, свинец, стрессорный фактор, Эпин-Экстра.

---

Цитирование: Грабовская, Н.И. Протекторное действие на растения препаратов, содержащих брассиностероиды, в условиях загрязнения среды свинцом (обзор) / Н.И. Грабовская, О.Н. Бабенко // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 129-163. DOI: 10.17516/1997-1389-0322

---

## Введение

Рынок всевозможных биостимуляторов является одним из самых быстрорастущих секторов сельского хозяйства. В настоящее время активно изучаются вопросы, касающиеся биологических свойств брассиностероидов (БС), совершенствуются технологии их синтеза и выделения природных соединений, разрабатываются на их основе новые препараты для применения в растениеводстве (Яхин и др., 2014). Препараты на основе БС обладают широким спектром стимулирующего и защитного действия, что приводит к увеличению урожайности и повышению качества сельскохозяйственной продукции. Они эффективные иммуномодуляторы, увеличивают устойчивость растений к стрессу, фитопатогенам, болезням, регулируют рост и развитие растений, улучшают бутон- и плодообразование, способствуют обильному цветению. Данные препараты рекомендуются для обработки различных сельскохозяйственных культур (зерновые, бобовые, картофель и овощи, сахарная свекла, лен, хлопок), а также для применения в декоративном садоводстве, ландшафтном дизайне и городском озеленении. Однако следует отметить, что как в инструкциях по применению препаратов на основе БС, так и в литературных источниках (Bajguz, Nayat, 2009; Allagulova et al., 2015; Sharma et al., 2016a; Sharma et al., 2016b; He et al., 2016; Rao, Raghu, 2017; Kohli et al., 2018; Wang et al., 2018; Planas-Riverola et al., 2019; Surgun-Acar, Zemheri-Navruz, 2019; Wu et al., 2019) отсутствует информация об эффективности и целесообразности применения БС, производным которых является биостимулятор Эпин-Экстра, в условиях загрязнения среды тяжелыми металлами (ТМ), в частности свинцом (Pb). Данный аспект требует дополнительного изучения, так как количество Pb в окружающей среде стабильно увеличи-

вается. Известно, что высокие концентрации Pb в почвах в значительной степени могут подавлять рост и развитие растений (Алексеев, 2008), что в свою очередь ведет как к снижению их продуктивности и устойчивости, так и к загрязнению ТМ продуктивных органов, используемых в пищевых и кормовых целях (Гармаш, 1983). Синтетические адаптогены растений на основе естественных фитогормонов, к которым относится Эпин-Экстра, физиологичны и безопасны для окружающей среды и способны в некоторой степени нивелировать вредное воздействие данного фактора. Поэтому при использовании регуляторов роста растений на основе фитогормонов нужно учитывать не только их способность увеличивать урожайность, но и способность влиять на безопасность растениеводческой продукции, в частности снижать кумуляцию Pb в продуктивных органах растений. В связи с этим представляется целесообразным изучение действия биостимуляторов, содержащих БС, на растения в условиях свинцового загрязнения окружающей среды.

## Эпин-Экстра как биостимулятор роста и антистрессовый адаптоген

Эпин-Экстра – зарегистрированный товарный знак Автономной некоммерческой организации «НЭСТ М» ([www.nest-m.ru](http://www.nest-m.ru)) и название препарата, содержащего в качестве действующего вещества (в концентрации 0,025 г/л) высокоочищенный 24-эпибрассинолид (рис. 1), относящийся к классу БС и синтезированный по оригинальной методике с использованием нанотехнологий (Патент РФ № 2272044 от 13.09.04 «Способ получения 24-эпибрассинолида», свидетельство о государственной регистрации № 1771 от 26.02.18 взамен ранее выданного свидетельства о государственной регистрации № 1119 от 20 мая 2016 г.).



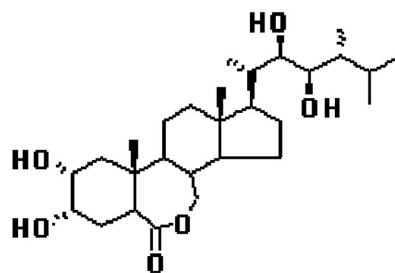


Рис. 1. Структурная формула 24-эпибрассинолида

Fig. 1. Structural formula of 24-epibrassinolide

На сегодняшний день Эпин-Экстра широко используется за рубежом в условиях проблемного земледелия, особенно в Японии (Ikekawa, Zhao, 1991; Sakurai et al., 1999; Toyama, 2000; Yamagami et al., 2018), Индии (Sharma et al., 2015; Sharma et al., 2016a; Sharma et al., 2016b; Sharma et al., 2019) и Китае (He et al., 2016; Zheng et al., 2017; Cai et al., 2019; Yin et al., 2019). Являясь синтетическим аналогом натурального фитогормона, он не опасен для человека и окружающей среды (IV класс опасности), не загрязняет почву, грунтовые и поверхностные воды, безопасен для рыб, пчел и других полезных насекомых. Имеются сведения, что данный регулятор роста даже стимулирует жизнедеятельность почвенных микроорганизмов, способствуя улучшению минерального питания растений (Пономаренко, 1999).

БС ( $C_{28}H_{48}O_6$ ) представляют собой класс стероидных гормонов, которые играют важную роль в регуляции роста и развития растений. Открыты они были сравнительно недавно (Khrupach et al., 2000). Еще в 1930-1940-е гг. учеными было высказано предположение о том, что в растениях можно обнаружить стероидные регуляторы роста по аналогии со стероидными гормонами животных (Skarzynski, 1933; Hassan, Wafa, 1947). В многочисленных биотестах растения подвергали обработке стероидными гормонами жи-

вотных, которые оказывали физиологическое действие (Love, Love, 1945). Например, эстрогены вызывали деление клеток в зародышах гороха (Korsecwicz, Rogozinska, 1972; Jones, Roddick, 1977), а с помощью тестостерона удалось изменить пол у растений бешеного огурца (*Ecballium elaterium* L.) (Korsecwicz, 1971) и сосны обыкновенной (*Pinus silvestris* L.) (Korsecwicz et al., 1977). Однако животные гормоны приходилось использовать в слишком высоких концентрациях (порядка 0,1 %), и вряд ли можно было говорить о специфичности полученных результатов. И только в 1979 г. было окончательно подтверждено наличие стероидных гормонов в растениях, когда американские ученые опубликовали данные о новом стероидном соединении под названием брассинолид, который был выделен ими из пыльцы рапса (*Brassica napus* L.), собранной пчелами (Grove et al., 1979). Три года спустя кастастерон, биосинтетический предшественник брассинолида, был выделен из галлов насекомых на каштане японском (*Castanea crenata* Sieb. & Zucc.) (Yokota et al., 1982). В настоящее время известно более 60 соединений с брассиностероидной активностью. Наибольшим содержанием этих веществ отличается пыльца растений, но БС были обнаружены также и в вегетативных органах, и в цветках (Fujioka et al., 1996; Toyama, 2000). Например, из настоящего каштана

(*Castanea sativa* Mill.) был выделен кастастерон, обнаруженный также в незрелых семенах периллы фруктовой (*Perilla frutescens* (L.) Britt.) и риса (*Oryzae sativa* L.) (Park et al., 1994), из рогоза (*Typha*) – тифастерол (Schneider et al., 1983), из чая (*Thea*) – теастерон (Abe et al., 1984), и т.д. Недавно БС были также обнаружены у печеночного мха (*Marchantia polymorpha* L.), зеленого мха (*Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.), плаунок (*Selaginella moellendorffii* Hieron. и *S. uncinata* (Desv. ex Poir.) Spring) и 13 видов папоротников (Yokota et al., 2017).

Биосинтез БС идет по мевалонатному пути (Муромцев и др., 1987; Fujioka, Sakurai, 1997; Clouse, Sasse, 1998) и включает общие для других терпеновых соединений (гибереллины, абсцизовая кислота (АБК), фузикооксины, каротиноиды) стадии: синтез изопентенилпирофосфата ( $C_5H_{12}P_2O_7$ ), геранилпирофосфата ( $C_{10}H_{20}P_2O_7$ ), фарнезилпирофосфата ( $C_{15}H_{28}P_2O_7$ ), сквалена ( $C_{30}H_{49}OH$ ). Первым специфическим продуктом, из которого происходит биосинтез остальных БС, является 24-метилхолестерол, превращающийся в кампестерин и кампестанол. От кампестанола расходятся две параллельные ветви биосинтеза, часто одновременно сосуществующие в растительных клетках: с ранним и с поздним окислением в С-6-положении. В итоге обе ветви биосинтеза заканчиваются брассинолидом – физиологически активным БС (Кретович, 1986).

Многие из ферментов биосинтеза БС были выделены и охарактеризованы благодаря мутациям, приводящим к карликовости, восстанавливаемой брассинолидом. Так, у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) мутации *dwf 1* и *dwf 6* (от dwarf – карлик) контролируют ранние этапы биосинтеза БС (до разделения на «ранний» и «поздний» путь биосинтеза) и обладают наиболее силь-

ным фенотипическим проявлением – мутанты достигают не более чем 1/30 высоты растений дикого типа. Мутация *dwf 4* затрагивает более поздние этапы биосинтеза БС (после развилки в метаболизме), поэтому фенотипическое проявление карликовости мягче (Choe et al., 1999; Noguchi et al., 2000).

БС – высокогидрофобные молекулы. Тем не менее при добавлении меченого брассинолида наблюдается его транспорт по побегу в акропетальном направлении. Зарегистрировано образование гидрофильных гликозидов, сульфатов и ацилпроизводных БС (Abe, 1989). Возможно, с образованием этих соединений и связан акропетальный транспорт брассинолида по растению. Хотя ферменты биосинтеза БС обнаружены почти во всех тканях растения, их концентрация наиболее высока в молодых тканях: этиолированных проростках, меристемах, флоральных примордиях, развивающейся пыльце (Abe, 1989; Bishop, Yokota, 2001). По-видимому, такое распределение БС вызвано процессами дальнего и ближнего транспорта. Однако некоторые авторы (Shimada et al., 2003) утверждают, что БС синтезируются в тканях, смежных с теми, где они функционируют. В своих исследованиях Г.М. Саймонс с соавторами (Symons, Reid, 2004) также не обнаружил доказательств переноса этих веществ на большие расстояния между различными тканями растения.

БС отличаются от ауксинов, цитокининов и этилена молекулярным строением и функциями (Davies, 2004). При действии БС на проростки они, как и ауксины, усиливают растяжение. Однако для ауксинов характерно быстрое растяжение, при котором активация  $H^+$ -помпы наблюдается через 10 мин с максимумом растяжения через 30-45 мин после воздействия, а для БС типична более замедленная реакция, которая начинается через 30 мин после воздействия и продолжается в

течение 1,5-2 ч. Если при этом в среду для роста растений добавить БС совместно с ауксинами, то они окажут гораздо больший стимулирующий эффект, чем при действии только ауксинов или только БС (Tran, Pal, 2014). На молекулярном уровне эффект растяжения, по-видимому, обусловлен активацией генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз (КсЭТ). Активация таких генов показана в разных растительных объектах. Это ген *TCH 4* арабидопсиса (*A. thaliana*) (Campbell, Braam, 1998; Piev et al., 2002), ген *BRU 1* сои (*Glycine max* (L.) Merr.) (Oh et al., 1996; 1998), ген *SIBRI 1* томатов (Zhu et al., 2019) и др. Белки КсЭТ после биосинтеза направляются в клеточную стенку и при взаимодействии с ксилоглюканами размягчают ее матрикс. Таким образом, если ауксины запускают процесс растяжения, то БС важны для его длительного поддержания.

Установлено, что БС регулируют процессы клеточной дифференцировки (Iwasaki, Shibaoka, 1991; Cano-Delgado et al., 2004; Yamamoto et al., 2007). Так, у мутантов арабидопсиса (*A. thaliana*) с подавленным ответом на брассиностероиды *bri 1* нарушалось формирование столбчатого мезофилла и уменьшалось количество проводящих элементов ксилемы (Clouse et al., 1996; Cano-Delgado et al., 2004). Процесс дифференцировки ксилемных элементов, как и в случае растяжения, запускают ауксины. Причем в этом процессе можно выделить три стадии: 1) первичная экспрессия генов, приводящая к накоплению фенилаланин-аммикалиазы (ФАЛ) и гидроксилазы коричной кислоты (ГКК); 2) остановка экспрессии этих генов и переориентация актиновых филаментов; 3) вторичный запуск синтеза ФАЛ и ГКК с дальнейшей сильной лигнификацией и апоптозом – запрограммированной гибелью клеток. Оказалось, что переход от стадии 2 к стадии 3 невозможен без БС. Таким образом, уже в двух случаях ауксины

и БС выступают как синергисты. БС и ауксин проявляют некоторые сходные физиологические эффекты, вероятно, благодаря их функциональному взаимодействию, но точный механизм этого взаимодействия пока неизвестен.

В то же время действие на корневую систему БС и ауксинов заметно различается: если ауксины стимулируют образование боковых корней, то БС в большинстве случаев ингибируют их образование (Gonzalez-Garcia et al., 2011). Однако существуют и противоположные данные. Так, БС стимулировали рост и развитие корневой системы льна-долгунца (в 1,3 раза по сравнению с фоном), причем увеличение корневой массы происходило в основном за счет образования боковых корешков (Кукреш, Ходянкова, 2002). А исследования Ф. Бао с соавторами (Bao et al., 2004) показали, что БС действуют синергически с ауксином, способствуя образованию латеральных корней у арабидопсиса (*A. thaliana*) за счет увеличения акропетального переноса ауксина (от основания до кончика) в корне.

БС взаимодействуют не только с ауксинами, но и с гиббереллинами, усиливая растяжение клеток. При повреждении биосинтеза БС проростки заметно уменьшаются в длине (Abe, 1989; Yin et al., 2019). Установлено, что эпибрассинолид оказывает более сильный стимулирующий эффект на рост растяжением по сравнению с индолилуксусной (ИУК) и гибберелловой (ГК) кислотами (Xu et al., 1990; Bai et al., 2012). Кроме того, без БС растения не способны удерживать апикальную петельку в согнутом состоянии, семядоли преждевременно раскрываются и биосинтез хлорофилла идет в темноте (Bai et al., 2012). Все эти реакции не характерны для растений, выращенных без света. Поэтому в настоящее время активно обсуждается участие БС в передаче световых сигналов и перекрест путей

фоторецепции и БС. Так, результаты, полученные С.Ю. Тищенко с соавторами (2001a, 2001b) при изучении влияния 24-эпибрассинолида на рост и гормональный баланс проростков арабидопсиса (*A. thaliana*), позволяют предположить регуляторную роль 24-эпибрассинолида в процессе фотоморфогенеза арабидопсиса на синем свете. Измерение уровня гормонов показало, что 24-эпибрассинолид увеличивал в 7-суточных проростках арабидопсиса содержание ИУК, цитокининов и особенно АБК (уровень которой был примерно в 3 раза выше, чем в контроле) и значительно уменьшал содержание связанных форм гиббереллинов группы ГК4,7 (Тищенко и др., 2001 а, b). В связи с этим можно предположить, что эпибрассинолид принимает участие в регуляции баланса эндогенных гормонов в растениях.

Некоторые исследования показывают, что БС и гиббереллины действуют независимо друг от друга, однако имеются данные о синергическом или аддитивном эффекте (Головацкая, Винникова, 2007). Так, в темноте у проростков арабидопсиса (*A. thaliana*) развивается апикальная петелька (структура, защищающая семядоли и апикальные меристематические ткани при прорастании через почву) за счет дифференциального удлинения и деления клеток на противоположных сторонах гипокотилия, где скорость удлинения клеток на внешней стороне больше, чем на внутренней (Silk, Erickson, 1978; Li et al., 2004). Было показано, что данный процесс управляется перекрестным взаимодействием между несколькими гормонами (De Grauwe et al., 2005; An et al., 2012). Известно, что ауксины, этилен и гиббереллины координированно взаимодействуют при образовании апикальной петельки (Achard et al., 2003; Li et al., 2004; Vriezen et al., 2004; De Grauwe et al., 2005; Zadnikova et al., 2010; Vandenbussche

et al., 2010). Исследования Накамуры с соавторами (Nakamura et al., 2003) продемонстрировали также регуляцию брассинолидами нескольких генов ауксинового ответа при образовании апикальной петельки. Участие БС в формировании апикальной петельки подтверждается и тем, что нарушение синтеза БС изменяет реакцию ауксина предположительно путем воздействия на транспорт ауксина (De Grauwe et al., 2005).

На свету подобная сложная гормональная регуляция была обнаружена на уровне удлинения гипокотилия, стимулировать которое могут как ауксины, гиббереллины, этилен или его предшественник 1-аминоциклопропан-1-карбоксильная кислота (АКК), так и БС (De Grauwe et al., 2005). Была предложена гипотеза о взаимодействии этилена с ауксинами (Smalle et al., 1997; Vandenbussche et al., 2003a), а также рассмотрена связь этилена и ауксинов с гиббереллинами (Saibo et al., 2003). Однако вопрос, где и как в этой сети гормональной регуляции вступают в игру БС, остается активно обсуждаемым.

Можно провести некоторые параллели между образованием апикальной петельки в темноте и удлинением гипокотилия на свету. Во-первых, оба процесса зависят от этилена и ауксина (Schwark, Schierle, 1992; Boerjan et al., 1996; Lehman et al., 1996; Smalle et al., 1997; Zhao et al., 2001; Vandenbussche et al., 2003a, 2003b; De Grauwe et al., 2005; Stepanova et al., 2008; An et al., 2012). Во-вторых, они оба имеют временное окно чувствительности (Raz, Ecker, 1999; Saibo et al., 2003). В-третьих, анализ *hls* мутантов арабидопсиса показывает, что их соответствующие генные продукты функционируют не только в этиленопосредованном образовании апикальной петельки в темноте, но и в этилен-стимулированном удлинении гипокотилия на свету (Vandenbussche et al., 2003a; De Grauwe et al.,

2005; An et al., 2012). Следовательно, эти реакции, по-видимому, контролируются одними и теми же механизмами. Необходимо отметить, что на свету БС способны компенсировать нечувствительность к этилену *hls* мутантов, что предполагает их существенную роль в данном процессе (De Grauwe et al., 2005).

В последнее время большое внимание уделяется изучению влияния БС на показатели продуктивности и урожайности сельскохозяйственных растений. Известно, что БС оказывают воздействие при более низких концентрациях ( $10^{-13}$ - $10^{-11}$  М), чем остальные фитогормоны (Khrpach et al., 2000). Наиболее простым и экономичным способом применения БС признано замачивание семян среднего размера в течение 6 ч в растворе гомобрассинолида (0,05 мг/л) с последующей подсушкой на воздухе перед посевом (Sairam, 1994). Установлена возможность его применения и путем опрыскивания, однако при этом больше расход препарата и, следовательно, выше общие денежные затраты.

Имеются многочисленные данные, что эпибрассинолиды стимулируют прорастание и всхожесть семян на 15-20 % (Budaj, 2000; Елагина, Вьюгина, 2001; Miransari, Smith, 2014; Kim et al., 2019; Small et al., 2019), способствуют формированию боковых побегов (Pugachov et al., 2000; Small, Degenhardt, 2018), увеличению площади ассимиляционной поверхности листьев, продуцированию большей биомассы (Sairam, 1994), улучшению клубне- и плодообразования на 17-34 % (Гайтер, 2001; Попова, 2001). У обработанных эпибрассинолидом растений также наблюдалось увеличение количества завязей плодов на 50 %, предотвращалось их опадание и ускорялись темпы образования и созревания плодов в среднем на 11 % (Гайтер, 2001).

Положительное влияние эпибрассинолида на продуктивность сельскохозяйственных

растений связывают с усилением дыхания, поглощения влаги и азота из почвы, что благоприятствует фотосинтезу, синтезу белков, активному росту и развитию растений и в конечном итоге формированию высокого урожая. Установлено, что применение БС увеличивает урожайность на 25-42 % (Стрельцова, Ольховик, 1990; Sairam, 1994; Гайтер, 2001; Попова, 2001; Gomes et al., 2006; Nayat et al., 2012; Serna et al., 2012; Ali, 2017).

Нужно также отметить, что обработка посадочного материала раствором эпибрассинолида снижает содержание нитратов в продукции в 2-3 раза (Budaj, 2000; Попова, 2001) и увеличивает накопление крахмала, аскорбиновой кислоты и других органических соединений (Попова, 2001), тем самым повышая питательную ценность сельскохозяйственной продукции. Влияние эпибрассинолида на транспорт и накопление в растениях ценных метаболитов в настоящее время активно изучается сотрудниками Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) (Горбылева, Боровский, 2018; Gyan'ko, 2018). Транспорт через вакуолярную мембрану сахаров, аминокислот, а в некоторых случаях и неорганических ионов ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ ) энергетически зависим. Полагают, что регуляция транспорта этих веществ может осуществляться через регуляцию активности  $H^+$ -АТФазы (Е.С. 3.6.1.34) и  $H^+$ -пирофосфатазы (Е.С. 3.6.1.1) (Stevens, Forgas, 1997; Forgas, 1998). Исследования Е.В. Прадедовой (2001) показали, что эпибрассинолид может одновременно регулировать и гидролитическую, и транспортную функции  $H^+$ -АТФазы и  $H^+$ -пирофосфатазы вакуолярной мембраны корнеплодов столовой свеклы, и эта регуляция зависит от стадии онтогенеза. Наряду с этим эпибрассинолид способен стимулировать поступление сахарозы только через активацию  $H^+$ -АТФазы тонопласта (со-

держание сахарозы увеличивалось на 40 %), тогда как в присутствии пиррофосфатазы эпибрасинолид не стимулировал поступление сахарозы в вакуоли (Озолина и др., 2007).

В инструкциях по использованию препарата Эпин-Экстра не рекомендуется при применении смешивать его с другими препаратами. Однако В.М. Гончарук с сотрудниками (2002) установила, что бинарные композиции 2'-5'-олигонуклеотидов и БС превосходили по своей биологической активности отдельно взятые компоненты. Причем урожай картофеля, полученный с применением указанных смесей, составил 179-242 % к контролю в тепличных условиях и 154-183 % – в полевых условиях, а комбинированные обработки семян ярового ячменя сорта Gopag смесями солей карбоксиметилцеллюлозы с 24-эпибрасинолидом, янтарной кислотой или экстрактом алкалоидов в полевых условиях привели к увеличению урожая на 0,26-0,39 т (Kabashnikova et al., 1998). Следовательно, вопрос о применении БС в комплексе с другими препаратами для обработок сельскохозяйственных культурных растений также нуждается в дальнейшем изучении, к тому же применение бинарных или других смесей позволит снизить нормы расхода составляющих их препаратов и сделать их перспективными для практического использования в качестве стимуляторов роста и развития растений.

В современной научной литературе имеются многочисленные данные о способности БС повышать толерантность растений к стрессовым воздействиям (Ali et al., 2007; Kagale et al., 2007; Ali et al., 2008; Bajguz, 2009; Bajguz, Nayat, 2009; Yuan et al., 2010; Nayat et al., 2012; Jiang et al., 2013; Fariduddin et al., 2014; Fang et al., 2019; Fu et al., 2019; Parmoon et al., 2019) и устойчивость к болезням (Abe, 1989; Елагина, Вьюгина, 2001; Кукреш, Ходянкова, 2002; Albrecht et al., 2012; Alazem, Lin, 2015; Deng et

al., 2016). БС являются природными адаптогенами, запускающими в растительных клетках защитные механизмы при стрессовых воздействиях: засухах (Пустовойтова, 1990; Sairam, 1994; Бабенко, 2004; Бабенко, Сафронова, 2007; Сафронова, Бабенко, 2008; Yuan et al., 2010; Nie et al., 2019; Wang et al., 2019), заморозках (Pociecha et al., 2015; Filek et al., 2017; Janeczko et al., 2019), высоких температурах (Sonjaroon et al., 2018; Bhattacharya, 2019), недостаточной освещенности (Kang et al., 2001; Li, He, 2016), пересадке, черенковании (Small, Degenhardt, 2018; Zhou et al., 2018). В стрессовых условиях в клетках растения повышается активность ферментов, изменяется структура и функция мембран (Dahse et al., 1990; Прадедова, 2001), ускоряется клеточное деление (Pugachov et al., 2000; Зубарев, 2001; Small, Degenhardt, 2018), синтезируется «шоковый» белок (Кулаева и др., 1989; Shigeta et al., 2015), повышающий термостабильность и термочувствительность мембран клетки. Антистрессовый эффект БС связывают с глубокими изменениями физиолого-биохимических процессов, в том числе и на уровне белоксинтезирующей системы (Watt, Cresswell, 1987).

В последнее время возможность растений переносить неблагоприятное воздействие разнообразных стрессорных факторов связывают с их способностью в неблагоприятных условиях переключаться между активацией и подавлением роста (Feng et al., 2016; Bechtold, Field, 2018). При этом решающую роль в ответах как на абиотический, так и биотический стрессы могут играть пути передачи сигнала, опосредованные фитогормонами (Verma et al., 2016). Считается, что ключевым путем, контролирующим реакцию растительного организма на неблагоприятное воздействие стрессорного фактора, является сигнальный путь АБК (Yoshida et al., 2014; Zhu et al., 2017). Однако не менее убедительные доказатель-

ства указывают на то, что БС также играют заметную роль в контроле баланса между нормальным ростом и устойчивостью к воздействию окружающей среды, действуя либо через перекрестное затухание сигналов с АБК-сигнальным путем, либо независимо (Planas-Riverola et al., 2019). Известно, что БС способствуют росту за счет активации транскрипционных факторов *BZR1* и *BESI* (Bechtold, Field, 2018). Недавно проведенное исследование показало, что стресс, вызванный засухой, подавляет сигнальный путь БС и, тем самым, рост клеток растения, способствуя деградации *BESI* посредством убиквитинирования и селективной аутофагии (Nolan et al., 2017).

Интеграция различных гормональных сигналов опосредует целый ряд реакций развития растительного организма и реакций на окружающую среду (Vandenbussche, Van Der Straeten, 2004). За последние два десятилетия многочисленных генетических и биохимических исследований, использующих *A. thaliana* в качестве модельного организма, были определены и охарактеризованы основные компоненты сигнального пути БС (Li, Chory, 1997; Li, Nam, 2002; Li et al., 2002; Nam, Li, 2002; Mora-Garcia et al., 2004; Vert et al., 2005; Wang, Chory, 2006; Tang et al., 2008; Yan et al., 2009; Li, 2010; Clouse, 2011; Hothorn et al., 2011; She et al., 2011; Wang et al., 2011; Wang et al., 2012; Zhu et al., 2013; Zhu et al., 2019). Восприятие БС происходит рецепторами, локализованными в мембранах клеток, далее нисходящие цитозольные регуляторы передают БС-опосредованные сигналы в ядро, где они активируют транскрипцию БС-отзывчивых генов, которые управляют клеточным ростом (Zhao, Li, 2012; Belkhadir, Jaillais, 2015). Соответственно, мутации в генах, кодирующих основные компоненты синтеза БС, приводят к выраженной карликовости, нарушению

роста и развития органов, ограничению продуктивности и урожайности растений (Li, Chory, 1997; Singh, Savaldi-Goldstein, 2015; Planas-Riverola et al., 2019). Несмотря на изученность компонентов сигнального пути БС, многие вопросы остаются неясными, в том числе клеточная специфичность БС, как сигнальный путь БС взаимодействует с другими гормональными путями при нормальных и экологически сложных сценариях и в каких тканях происходит синтез БС (Cano-Delgado, Blazquez, 2013; Vukasinovic, Russinova, 2018).

В настоящее время активно ведутся работы по расшифровке механизмов, с помощью которых БС-опосредованная сигнализация регулирует адаптацию к биотическим (De Bruyne et al., 2014) и абиотическим (Lozano-Duran, Zipfel, 2015; Nolan et al., 2017) стрессам. На данный момент мировым научным сообществом предложено несколько механизмов, объясняющих, как сигнальный путь БС опосредует адаптацию к стрессу. К ним относятся: 1) точная настройка стресс-чувствительных транскрипционных механизмов (Ye et al., 2017); 2) активация антиоксидантных механизмов (Xia et al., 2009; Kim et al., 2012; Lima, Lobato, 2017; Tunc-Ozdemir, Jones, 2017; Zou et al., 2018); 3) стимулирование выработки осмопротекторов (Fabregas et al., 2018). Следовательно, БС играют ключевую роль в поддержании нормального роста растений как в нормальных условиях, так и в ответ на воздействие негативных факторов окружающей среды, и в настоящее время имеется достаточно данных, подтверждающих идею о том, что модификация сигнального пути БС может быть стратегическим направлением для разработки более адаптированных сельскохозяйственных культур.

Вышеперечисленные особенности воздействия эпибрассинолида на растения позволяют рассматривать биостимулятор

Эпин-Экстра (действующее вещество 24-эпи-брассинолид) как эффективный, экологически чистый регулятор роста и развития растений как в нормальных условиях, так и под воздействием стрессорных факторов.

### **Протекторное действие Эпин-Экстра в условиях свинцового загрязнения среды**

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, среди поллютантов, оказывающих негативное влияние на человека, ТМ занимают второе место, уступая лишь пестицидам и значительно опережая такие хорошо известные загрязнители окружающей среды, как двуокись углерода и серы. Около 11 % почв территории России имеют высокий уровень загрязнения ТМ (Титов и др., 2014). Одним из ТМ, чье количество в окружающей среде стабильно увеличивается, является Pb. По разведанным запасам Pb страны Восточной Европы, Кавказа и Центральной Азии (ВЕКЦА) занимают первое место в мире. На их долю приходится 22,4 % мировых подтвержденных запасов металла. Наиболее значительные запасы Pb заключены в месторождениях Казахстана (40,3 % от запасов стран ВЕКЦА), России (36,1 %) и Узбекистана (11,4 %). На остальные страны – Азербайджан, Армению, Грузию, Киргизию, Таджикистан и Украину – приходится всего 12,2 % запасов Pb, разведанных в странах ВЕКЦА. 92 % запасов Pb этих стран приурочены к месторождениям полиметаллических и свинцово-цинковых руд. Анализ мирового потребления Pb показывает увеличение процента вторичного Pb до 85-90 % (Сперанская, 2008).

Основными источниками поступления и накопления Pb в окружающей среде с последующей интоксикацией живых организмов, в том числе и организма человека, являются предприятия цветной металлургической и химической промышленности, выбросы авто-

транспорта (LeGalley et al., 2013; Muzychenko et al., 2017), переработка свинцово-кислотных аккумуляторных батарей (Liu et al., 2014), применение свинцовых красок (O'Connor et al., 2018) и т.д. С 1921 г. было налажено производство этилированного бензина, в котором октановое число повышалось посредством использования тетраэтилсвинца, что обеспечивало антидетонационный эффект. В связи с ухудшением экологической ситуации, связанной с накоплением Pb в биосфере, в России, США, странах Евросоюза производство и использование этилированного бензина с присадкой тетраэтилсвинца в качестве антидетонатора были полностью запрещены к 2003 г. Исключение свинцовых добавок из бензина и запрет красок на основе Pb привели к незначительному снижению содержания свинца в атмосфере во всем мире (Skerfving, Bergdahl, 2015). Однако за годы использования этилированного бензина с присадкой тетраэтилсвинца содержание Pb в биосфере значительно увеличилось и продолжает стабильно возрастать (Давыдова, Тагасов, 2002), поэтому проблема загрязнения окружающей среды Pb не теряет своей актуальности.

К тому же расширение индустриализации значительно увеличивает накопление ТМ в верхнем слое почвы, особенно на сельскохозяйственных полях. Максимальные нагрузки выпадений Pb, ведущие к деградации экосистем, наблюдаются в Московской, Владимирской, Новгородской, Рязанской, Тульской, Ростовской и Ленинградской областях России (Сперанская, 2008). В культурном агроландшафте по степени распространенности Pb занимает второе место, уступая лишь цинку (Zn) (Алексеев, 2008). По результатам мониторинга, проведенного Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора совместно с Институтом питания Российской академии медицинских наук,



в целом по России в 0,8 – 4 % изученных проб пищевых продуктов наблюдалось превышение содержания ТМ, в том числе по Pb и кадмию (Cd) (Спринчак, 2004; Бокова, 2005).

Проблема свинцового загрязнения окружающей среды актуальна и для Казахстана (Muzychenko et al., 2017). Ежегодно в Казахстане с промышленными выбросами в атмосферный воздух поступает более 1 тыс. т Pb. «Лидерами» в этом процессе являются Карагандинская, Восточно-Казахстанская и Южно-Казахстанская области, на долю которых приходится 99,8 % от общего объема выбросов Pb в стране (Корчевский и др., 2010). Проблема свинцового загрязнения имеет место даже в тех городах, где отсутствуют крупные промышленные предприятия, таких как Петропавловск (Северо-Казахстанская область) и Кокшетау (Акмолинская область). Так, при определении физико-химических показателей проб талого снега (рН, содержание нитратов, Zn, Pb, меди (Cu) и Cd), взятых в различных точках г. Кокшетау (Казахстан), было выявлено превышение ПДК Pb в 2,7 (в пробах, взятых вблизи котельной) и 1,7 раза (в пробах, взятых вблизи автомагистрали), тогда как все остальные показатели были в пределах нормы (Грабовская, 2017а). Аналогично было выявлено превышение содержания Pb в пробах почвы, взятых из санитарно-защитной зоны завода им. Кирова г. Петропавловска (Казахстан) – в 2 раза, а также в пробах почвы, взятых из санитарно-защитной зоны теплоэлектростанции, – в 1,5 раза (Грабовская, 2017б).

В организм человека большая часть ТМ, в том числе и Pb, поступает преимущественно с продуктами питания (Liu et al., 2010; Liu et al., 2014; Gardener et al., 2019; Obiora et al., 2019), а также с водой (Pragst et al., 2017) и пылевыми аэрозолями (Jäger, 2003; Li et al., 2009; Absalon, Šlesak, 2010; Skerfving, Bergdahl, 2015; Maret, 2017; Bai et al., 2019). В

оптимальных дозах многие ТМ являются эссенциальными для растений и животных и необходимы для протекания важнейших физиологических процессов (Немерешина и др., 2013). Если же количество ТМ, поступающих в живые организмы, превышает оптимальные значения, то это оказывает токсическое действие, способствуя проявлению различных патологий (Немерешина и др., 2011; Дрогайцева, Петрова, 2014). Особо фитотоксичными элементами считаются те, которые оказывают вредное действие на тест-организмы при концентрации в питательном растворе до 1 мг/л. К таким элементам относятся, например, ионы таких металлов, как серебро (Ag), бериллий (Be), стронций (Sr), ртуть (Hg) и другие, а также, вероятно, ионы Pb (Алексеев, 2008).

По классификации Международного комитета по проблемам окружающей среды Pb относится к I классу опасности (Спитковский и др., 1994). Высокие концентрации Pb в почвах в значительной степени могут подавлять рост и развитие растений (Алексеев, 2008). Pb не является эссенциальным элементом, хотя и обнаруживается в каждом растении (Ильин, 1991). Описан эффект торможения метаболизма растений, который возникает из-за низкого содержания Pb в почве (Rout, Das, 2003). По некоторым данным, в небольших количествах он способен ускорять прорастание семян, повышать содержание крахмала и стимулировать рост (Ягодин и др., 1989, 2002). Следует отметить, что Pb медленнее, чем другие ТМ, поступает в растения и транспортируется из корня в надземные органы (Fogoughi et al., 1982; Серегин, Иванов, 1998).

Коэффициент биологического поглощения (КБП) – показатель, характеризующий способность растений поглощать металлы из почвы, – представляет собой отношение содержания металла в растении к его содер-

жанию в почве. По данным С.Ф. Покровской (1995), для многих растений (горох, кукуруза, овес, и т.д.) КБП Pb составляет 0,001-0,005 (для сравнения: КБП Cd для этих же культур составляет 0,01-0,5). Одна из причин низкого КБП Pb растениями заключается в том, что ионы Pb в почве быстро теряют свою подвижность, так как вступают в химические реакции с образованием малорастворимых соединений: молибдатов, сульфатов, фосфатов, карбонатов, гидроксидов, хроматов, а также поглощаются минеральными органическими коллоидами (Алексеев, 2008).

Фитотоксичность Pb в значительной степени нивелируется наличием в растительной клетке хорошо действующей системы инактивации элемента, проникающего в корневую систему, поэтому основная часть Pb задерживается в корнях растений (Серегин, Иванов, 1998). В опытах Н.Ю. Гармаш (1983) было показано, что в солому пшеницы поступает менее 1 %, а в ботву картофеля – 2 % Pb, содержащегося в корнях. При этом и в зерне пшеницы, и в клубнях картофеля содержание Pb не зависело от дозы его внесения в почву, и лишь при концентрации 200 мг/кг оно незначительно возрастало. Но при высоких концентрациях Pb в почвах ингибируется всасывание железа (Fe), что проявляется развитием хлороза и существенным подавлением роста растений, снижением продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений, загрязнением продуктивных органов ионами Pb (Алексеев, 2008).

Экспериментально установлены и доказаны следующие механизмы воздействия Pb на клетку. Pb взаимодействует с ДНК клетки и провоцирует мутации (Reichmaug-Lais, Kurchgessner, 1984; Реутова, Шевченко, 1992; Gichner et al., 2008; Pourrut et al., 2011; Zhang et al., 2014). Он частично ингибирует системы репарации, что снижает их эффективность,

поэтому возрастает выход мутаций за счет части спонтанных и индуцированных поврежденных молекул ДНК, которые в норме репарируются бы (Hartwig et al., 1990). Также Pb оказывает общее токсическое действие на клетку за счет образования устойчивых комплексов с аминокислотами (Venugopal, Luckey, 1978; Динева и др., 1993). Нужно учитывать и эффект суммации, обусловленный тем, что в естественных условиях на организм часто влияет не один какой-либо стрессорный фактор, происходит комплексное стрессорное воздействие среды. Н.В. Гончаровой (2005) было изучено комплексное воздействие на растения ионизирующего излучения и повышенного содержания в почве Pb. Согласно результатам ее исследования, небольшие дозы облучения (2 сГр) в сочетании с разными концентрациями Pb вызывают антагонистические эффекты, а доза 20 сГр в этих же условиях приводит к синергизму – количество мутаций в клетках исследуемых растений достоверно увеличивается. При этом способность растений противостоять неблагоприятному воздействию стрессорных факторов (засуха, ТМ, патогены, УФ-облучение, экстремальные температуры, озон, свет высокой интенсивности, оводнение и др.) во многом зависит от антиоксидантных систем растительного организма (Hallgren, Gezelius, 1982; Hertzberg, Mac Donell, 2002; Сынзыныс и др., 2005).

Способность растений накапливать ТМ, в частности Pb, не одинакова и зависит от их видовой принадлежности (Fan et al., 2017; Cheshmazar et al., 2018; Sihlahla et al., 2019). Вместе с тем, выявление растений-аккумуляторов имеет большое практическое значение как в плане безопасного выращивания на почвах, загрязненных токсическими элементами, так и в использовании в качестве тест-объектов в опытах по изучению посту-

пления и распределения ксенобиотиков в различных органах растений и поиска эффективных адаптогенов. М.А. Зварих и И.Г. Миллс (Zwarich, Mills, 1982) получили экспериментальные данные, касающиеся накопления ТМ овощными растениями: овощным горохом, салатом и морковью. Эти культуры выращивали на почвах, удобренных осадками сточных вод, содержащими: Zn – 2920; Cd – 22; Cu – 790; Pb – 408 мг/кг сухого вещества. Под овощи внесли 55, 110 и 200 т/га воздушно-сухого вещества осадка. Почва имела pH 6,7 и содержала 3,5 % углерода. В результате проведенного эксперимента было установлено, что наибольшей способностью накапливать исследуемые металлы обладает салат; например, для Pb этот показатель равен 1,6 мг/кг сухой массы (для сравнения: морковь – 0,9, овощной горох – 0,2 мг Pb на 1 кг сухой массы соответственно).

В условиях увеличивающейся «свинцовой нагрузки» на биосферу обеспечить защиту растений можно двумя путями. Во-первых, прямым воздействием на неблагоприятный фактор, т.е. снизить количество Pb, поступающего в геосистемы. Во-вторых, активацией защитных функций самого растительного организма. Поэтому одной из основных задач является поиск различного рода адаптогенов, которые могли бы уменьшить это негативное воздействие. С точки зрения возможности практического применения перспективным представляется использование естественных фитогормонов из группы брассиностероидов. Как было отмечено рядом авторов (Ikekawa, Zhao, 1991; Li, Van Staden, 1998; Sasse, 1999; Ali et al., 2007; Kagale et al., 2007; Bajguz, Nayat, 2009; Yuan et al., 2010; Nayat et al., 2012; Jiang et al., 2013; Fang et al., 2019; Fu et al., 2019), именно БС играют основную роль в повышении устойчивости растений к таким внешним стрессорам, как экстремаль-

ные температуры, засуха, ТМ, затопление, засоление, повреждение гербицидами, поражение патогенами. Главное преимущество использования БС заключается в том, что они не вредят окружающей среде, поскольку действуют в естественных дозах и естественным путем, а также не индуцируют коэволюцию вредителей (Khrpach et al., 2000). В то же время применение большинства стимуляторов роста может интенсифицировать поглощение растениями из почвы минеральных соединений. По имеющимся данным, система поглощения и транспорта металлов у растений недостаточно специфична (Clemens et al., 2002). По этой причине существует опасность накопления в тканях и органах растений в избыточном количестве как неэссенциальных, так и эссенциальных элементов. Применение большинства регуляторов роста в современном растениеводстве повышает потенциальный риск превышения допустимого содержания ТМ в растениях. Однако синтетический препарат Эпин-Экстра позиционируется как универсальный стимулятор роста растений и адаптоген, применение которого нивелирует воздействие на растения таких стрессорных факторов, как воздействие экстремальных температур, засухи, повышенного содержания в почве ТМ, радионуклидов и пр., что достигается посредством стимуляции собственного иммунитета растений; он обеспечивает повышение устойчивости к заболеваниям практически у всех сельскохозяйственных культур (Шаповал и др., 2014). Следует акцентировать внимание на том, что Эпин-Экстра снижает аккумуляцию химических элементов и их соединений, находящихся в избытке, что важно для безопасности и качества растениеводческой продукции. Анализируя имеющиеся данные исследований (Bajguz, 2000; Kaur, Bhardwaj, 2003; Janeczko et al., 2005; Прусакова, Чижова, 2005; Sharma,

Bhardwaj, 2007), можно заключить, что основной причиной уменьшения проявления токсического действия ТМ при обработке БС служит уменьшение их кумуляции в органах растения.

В настоящее время опубликовано ограниченное количество результатов исследований (Володькин, 2003; Janeczko et al., 2005; Титов и др., 2011; Nayat et al., 2012; Грузнова, 2017), непосредственно касающихся применения БС и синтетических препаратов на их основе с целью защиты сельскохозяйственных видов растений в условиях загрязнения среды ТМ, в частности Pb. Например, было показано, что обработка клубней картофеля 0,4%-ным рабочим раствором препарата Эпин-Экстра и вегетативной массы в фазе бутонизации 0,02%-ным рабочим раствором снижает содержание в них Pb, астата (At), Zn и Cu (Володькин, 2003). Обработка препаратом Эпин-Экстра (предпосевное замачивание и опрыскивание вегетирующих растений) дало положительный результат при выращивании свеклы столовой сорта «Бордо» и перца сладкого сорта «Родник» на почвах, загрязненных Pb и Cd. Применение данного биостимулятора способствовало повышению урожайности и снижению концентрации ТМ в готовой продукции как свеклы, так и перца. При этом увеличение урожайности перца было максимальным и составило 20,6 % по сравнению с контролем (Титов и др., 2011). К.А. Грузновой (2017) было показано дифференцированное влияние регуляторов роста на про- и антиоксидантную активность растений пшеницы в присутствии различных концентраций ТМ в среде, в том числе и Pb: регуляторы растений Цитодеф и Тидазурон могут оказывать как синергическое, так и антагонистическое с ионами ТМ действие, тогда как Эпин-Экстра и Рибав-Экстра оказывают только антагонистическое действие, поэтому их применение в

условиях загрязнения среды ТМ, в том числе и Pb, является наиболее предпочтительным ввиду большей эффективности протектирующего действия.

В исследованиях Н.И. Грабовской (2018) при изучении протектирующего действия Эпин-Экстра на семена и растения кресс-салата, которые помещали в среды с повышенным содержанием Pb, было выявлено негативное воздействие ионов Pb на всхожесть семян. Концентрации общего Pb в среде в 50, 100 ПДК для почвы (1600, 3200 мг/кг) и выше летальны – 100 % семян погибало и протектирующее действие Эпин-Экстра не определялось. Ростовые показатели 10-дневных растений, выращенных в среде с повышенным содержанием Pb, были заметно снижены по сравнению с проростками, выращенными в бессвинцовой среде. Наибольшее токсическое воздействие Pb оказывал на корневую систему, подавляя ее рост и развитие. Снижение формирования корневой системы наблюдалось уже при концентрации Pb свыше 10 ПДК для почвы (320 мг/кг). По сравнению с контролем у тест-объектов, выращенных в среде с повышенным содержанием Pb, формирование корневой системы блокировалось на 85-90 %, что весьма существенно (рис. 2).

В условиях загрязнения Pb применение Эпин-Экстра улучшало ростовые показатели корневой системы на 11-28 %. Влияние Pb на побеги было не столь выражено, как на корень. В среднем, снижение ростовых показателей побега составило 50-75 % по сравнению с контролем. Также было замечено, что при концентрациях Pb, близких к критическим, происходит разрушение хлорофилла и нарушение обмена веществ, что вызывает пожелтение и искривление побегов. Применение Эпин-Экстра улучшало ростовые показатели побегов на 0,7-17 %. Таким образом, протектирующее действие препарата Эпин-Экстра



Рис. 2. Ингибирующее действие свинца на развитие корневой системы и побега у кресс-салата (*Lepidium sativum*) сорта Данский (фото Н.И. Грабовской). Показаны растения кресс-салата на пятый день вегетации. Слева – контрольное растение кресс-салата, выращенное в бессвинцовой среде; справа – опытное растение кресс-салата, выращенное в среде с концентрацией Pb 1200 мг/л

Fig. 2. Inhibitory effect of lead on the development of the root system and shoot in cress plants (*Lepidium sativum*) of the Dansky variety (photo of Grabovskaya N.I.). Cress plants on the fifth day of vegetation are shown. On the left – the cress plant grown in a lead-free medium (control); on the right – the cress plant grown in a medium with Pb concentration of 1200 mg/L

было более выраженным на корневой системе, нежели на побеге. При концентрациях Pb в среде свыше 30 ПДК для почвы (960 мг/кг) рост растений значительно ингибируется. Следовательно, применение препарата Эпин-Экстра наиболее целесообразно при концентрациях общего Pb около 10-30 ПДК для почвы (320-960 мг/кг).

### Заключение

В связи с ухудшением экологической ситуации и деградацией экосистем разного уровня тенденция воздействия на растения неблагоприятных факторов будет нарастать, поэтому применение естественных, безопасных для окружающей среды и человека биостимуляторов является весьма перспективным направлением и требует дальнейших исследований с целью повышения эффективности и безопасности их использования. Очевидно, что данный вопрос требует дальнейшего изучения еще и ввиду того, что

различные ТМ обладают разнообразными механизмами патологического действия на растительную клетку, следовательно, эффективность применения синтетических препаратов на основе БС также может значительно варьировать.

Вероятно, что подобного рода исследования целесообразно проводить методом биотестирования на проростках с использованием растений-индикаторов, так как это позволяет создать стандартизированные условия, более точно регулировать концентрацию как ТМ, так и биостимулятора, что даст более достоверные результаты по сравнению с опытами в открытом грунте.

При подборе растительных регуляторов для нивелирования того или иного стрессорного фактора необходимо учесть целый ряд детерминант. Во-первых, концентрационные эффекты регуляторов роста, направленные против стрессорных воздействий, очень зависят от вида стрессора, его дозы, особен-

ностей растений и условий их выращивания, поэтому невозможно подобрать одну-две какие-то концентрации регуляторов роста, позволяющие эффективно бороться с абиотическим/антропогенным стрессом. Во-вторых, поскольку синтетические (а также многие природные) экзогенные регуляторы роста являются ксенобиотиками для растений, они могут оказывать как положительные, так и негативные эффекты (в норме и при стрессах). В-третьих, все фитогормоны в растении создают общую регуляторную сеть (Лукаткин, Лукаткин, 2017), и возмущение, создаваемое введением одного какого-либо дополнительного экзогенного регулятора роста, провоцирует серьезные изменения в работе целостной гормональной системы растения. К тому же при применении стимуляторов для улучшения состояния растений при стрессе, вызванном воздействием ТМ, в том числе и Рb, нужно учитывать, что некоторые стимуляторы на основе фитогормонов и гормоноподобных соединений интенсифицируют накопление рас-

тениями эссенциальных и неэссенциальных элементов, находящихся в среде (особенно избыточных), что в условиях избыточности ТМ в среде может ухудшить качество растениеводческой продукции или сделать ее непригодной для употребления. Тогда как при применении биостимуляторов для защиты растений от большинства неблагоприятных факторов, имеющих физическую природу (экстремальные низкие и высокие температуры, засуха и прочее), этой особенностью можно пренебречь.

Следовательно, в условиях свинцового загрязнения среды синтетические препараты на основе БС (в том числе и Эпин-Экстра), по видимому, являются приоритетными, так как не только повышают урожайность сельскохозяйственных культур в условиях химического загрязнения среды, улучшая ростовые показатели, но и положительно влияют на их качество, так как протектирующее действие достигается посредством снижения кумуляции ТМ в продуктивных органах растений.

### Список литературы / References

Алексеев Ю.В. (2008) *Тяжелые металлы в агроландшафте*. СПб., ПИЯФ РАН, 216 с. [Alekseev Yu.V. (2008) *Heavy metals in agrolandscape*. St. Petersburg, V.P. Konstantinov Petersburg Institute for Nuclear Physics of the Russian Academy of Sciences, 216 p. (in Russian)]

Бабенко О.Н. (2004) Влияние водного стресса и регуляторов роста на проростки пшеницы. *Тезисы докладов Республиканской научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной 50-летию освоения целины*, с. 107-108 [Babenko O.N. (2004) Effect of water stress and growth regulators on wheat seedlings. *Abstracts of the reports of the Republican Scientific-Practical Conference of Young Scientists and Students Dedicated to the 50<sup>th</sup> Anniversary of the Development of Virgin Lands*, p. 107-108 (in Russian)]

Бабенко О.Н., Сафронова Н.М. (2007) Влияние водного стресса и регуляторов роста на морфофизиологические показатели проростков яровой пшеницы. *Стратегические вопросы мировой науки-2007*, 2 (10): 24-26 [Babenko O.N., Safronova N.M. (2007) Effect of water stress and growth regulators on the morphological and physiological parameters of spring wheat seedlings. *Strategic Issues of World Science-2007*, 2 (10): 24-26 (in Russian)]

Бокова Т.И. (2005) *Закономерности детоксикации антропогенных загрязнителей (тяжелых металлов) в системе почва – растение – животное – продукт питания человека*. Красноярск, Красноярский государственный аграрный университет, 345 с. [Bokova T.I. (2005)

*Regularities of detoxification of anthropogenic pollutants (heavy metals) in the soil – plant – animal – human food system.* Krasnoyarsk, Krasnoyarsk State Agrarian University, 345 p. (in Russian)]

Володькин А.А. (2003) Изменение содержания тяжелых металлов и радионуклидов в клубнях картофеля в зависимости от применения регуляторов роста. *Бюллетень Всероссийского НИИ удобрений и агропочвоведения*, 118: 219-221 [Volodkin A.A. (2003) Changes in the contents of heavy metals and radionuclides in potato tubers, depending on the use of growth regulators. *Bulletin of the All-Russian Research Institute of Fertilizers and Soil Science* [Byulleten' Vserossiyskogo NII udobreniy i agropochvovedeniya], 118: 219-221 (in Russian)]

Гайтер П. (2001) Влияние эпина на рост и развитие томатов. *Тезисы докладов конференции молодых ученых СО РАН, посвященной М.А. Лаврентьеву*, с. 38-42 [Gaiter P. (2001) The effect of epin on growth and development of tomatoes. *Abstracts of the reports of the Conference of Young Scientists of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Dedicated to M.A. Lavrentiev*, p. 38-42 (in Russian)]

Гармаш Н.Ю. (1983) Воздействие повышенного содержания тяжелых металлов в субстрате на пшеницу и картофель. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 10-2: 84-87 [Garmash N.Yu. (1983) Effect of increased content of heavy metals in the substrate on wheat and potatoes. *Proceedings of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. Biological Sciences Series* [Izvestiya Sibirskogo otdeleniya Akademii nauk SSSR. Seriya biologicheskikh nauk], 10-2: 84-87 (in Russian)]

Головацкая И.Ф., Винникова Ю.М. (2007) Роль гиббереллинов и брассиностероидов в регуляции роста и развития арабидопсиса. *Вестник Томского государственного педагогического университета*, 6(69): 48-53 [Golovatskaya I.F., Vinnikova Y.M. (2007) The role of giberellins and brassinosteroids in regulation of growth and development. *Tomsk State Pedagogical University Bulletin* [Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta], 6(69): 48-53 (in Russian)]

Гончарова Н.В. (2005) *Растения и антропогенные стрессоры (биомониторинг)*. Минск, Триолета, 90 с. [Goncharova N.V. (2005) *Plants and anthropogenic stressors (biomonitoring)*. Minsk, Trioleta, 90 p. (in Russian)]

Гончарук В.М., Быховец С.Л., Быховец А.И., Михайлопуло И.А., Ковканко Н.В., Квасюк Е.И., Кулак Т.Н., Кашкан Ж.Н. (2002) Влияние композиций 2'-5'-олигонуклеотидов и брассиностероидов на урожай клубней картофеля. *Вестник института биоорганической химии НАН Беларуси*, 127-129 [Goncharuk V.M., Bykhovets S.L., Bykhovets A.I., Mikhaylopulo I.A., Kovkanko N.V., Kvasyuk E.I., Kulak T.N., Kashkan Zh.N. (2002) Effect of 2'-5'-oligonucleotide and brassinosteroid compositions on potato tubers yield. *Bulletin of the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus* [Vestnik instituta bioorganicheskoy khimii NAN Belarusi], 127-129 (in Russian)]

Горбылева Е.Л., Боровский Г.Б. (2018) Биостимуляторы роста и устойчивости растений терпеноидной природы и другие биологически активные соединения, полученные из хвойных пород. *Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 8(4): 32-41 [Gorbyleva E.L., Borovskii G.B. (2018) Growth and stability biostimulators for plants containing terpenoids and other biologically-active compounds. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology* [Izvestiya Vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya], 8(4): 32-41 (in Russian)]

Грабовская Н.И. (2017a) Определение уровня загрязнения окружающей среды урбано-ноза свинцом на основании анализа талого снега. *Материалы VII Международной научно-практической конференции «Эколого-экономическая эффективность природопользования на современном этапе развития Западно-Сибирского региона»*, с. 10-13 [Grabovskaya N.I. (2017a) Determining the level of environmental contamination of urban ecosystem by lead based on analysis of thawed snow. *Proceedings of the VII International Scientific and Practical Conference “Environmental and Economic Efficiency of Nature Management at the Present Stage of Development of the West Siberian Region”*, p. 10-13 (in Russian)]

Грабовская Н.И. (2017b) Определение загрязненности почвы свинцом в пределах городской черты Петропавловска (Северо-Казахстанская область). *Материалы VII Международной научно-практической конференции «Эколого-экономическая эффективность природопользования на современном этапе развития Западно-Сибирского региона»*, с. 13-15 [Grabovskaya N.I. (2017b) Determination of soil pollution by lead within the city limits of Petropavlovsk (North Kazakhstan Region). *Proceedings of the VII International Scientific and Practical Conference “Environmental and Economic Efficiency of Nature Management at the Present Stage of Development of the West Siberian Region”*, p. 13-15 (in Russian)]

Грабовская Н.И. (2018) Защитное действие эпина на растения в условиях загрязнения среды свинцом на примере кресс-салата (*Lepidium sativum*). *Приоритетные векторы развития промышленности и сельского хозяйства*, 1(3): 57-61 [Grabovskaya N.I. (2018) Protective effect of epin on plants in the conditions of environmental pollution with lead by the example of cress (*Lepidium sativum*). *Priority Vectors for the Development of Industry and Agriculture*, 1(3): 57-61 (in Russian)]

Грузнова К.А. (2017) Влияние экзогенных регуляторов роста на степень токсичности тяжелых металлов в растениях пшеницы. М., РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 24 с. [Gruznova K.A. (2017) *The effect of exogenous growth regulators on the toxicity of heavy metals in wheat plants*. Moscow, Russian State Agrarian University- Timiryazev Moscow Agricultural Academy, 24 p. (in Russian)]

Давыдова С.Л., Тагасов В.И. (2002) Тяжелые металлы как супертоксиكانты XXI века. М., Изд-во РУДН, 140 с. [Davydova S.L., Tagasov V.I. (2002) *Heavy Metals as Supertoxicants of the 21st Century*. Moscow, RUDN University, 140 p. (in Russian)]

Динева С.Б., Абрамов В.И., Шевченко В.А. (1993) Генетические последствия действия нитрата свинца на семена хронически облучаемых популяций *Arabidopsis thaliana*. *Генетика*, 29(11): 1914-1919 [Dineva S.B., Abramov V.I., Shevchenko V.A. (1993) Genetic effects of lead nitrate on seeds of chronically irradiated populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics [Genetika]*, 29(11): 1914-1919 (in Russian)]

Дрогайцева А.А., Петрова Г.В. (2014) Накопление тяжелых металлов в экосистеме «почва – растения» *Melampyrum arvense* L. степной зоны оренбургского Предуралья. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*, 6(50): 144-146 [Drogaitseva A.A., Petrova G.V. (2014) Accumulation of heavy metals in the ecosystem “soil – plants” *Melampyrum arvense* L. in the steppe zone of the Orenburg Urals. *Newsletter of Orenburg State Agrarian University [Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta]*, 6(50): 144-146 (in Russian)]

Елагина Е.М., Вьюгина Г.В. (2001) Ростовые и фотосинтетические показатели проростков огурцов в связи с пикировкой и обработкой эпибрассинолидом. *Актуальные вопросы эко-*



логической физиологии растений в XXI веке, с. 220-221 [Yelagina E.M., Vyugina G.V. (2001) Growth and photosynthetic parameters of cucumber seedlings in connection with top removal and epibrassinolide treatment. *Current Issues of Plant Ecological Physiology in the XXI Century*, p. 220-221 (in Russian)]

Зубарев А.В. (2001) Влияние эпибрасинолида на процесс каллусогенеза и содержание нуклеиновых кислот в листовых дисках табака (*Nicotiana tabacum* L.). Тезисы докладов конференции молодых ученых СО РАН, посвященной М.А. Лаврентьеву, с. 43-44 [Zubarev A.V. (2001) Effect of epibrassinolide on callusogenesis and nucleic acid content in tobacco leaf disks (*Nicotiana tabacum* L.). *Abstracts of the Reports of the Conference of Young Scientists of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences Dedicated to M.A. Lavrentiev*, p. 43-44 (in Russian)]

Ильин В.Б. (1991) Тяжелые металлы в системе почва – растение. Новосибирск, Наука, 151 с. [Ilyin V.B. (1991) *Heavy metals in the soil – plant system*. Novosibirsk, Nauka, 151 p. (in Russian)]

Корчевский А., Яковлева Н., Мартынова В., Избакиев А., Идаятов П. (2010) Оценка загрязнения окружающей среды Республики Казахстан свинцом, разработка подходов к снижению экологических рисков. VI Международная научно-практической конференция «Тяжелые металлы и радионуклиды в окружающей среде», с. 230-233 [Korchevsky A., Yakovleva N., Martynov V., Izbakiev A., Idayatov P. (2010) Assessment of environmental pollution of Kazakhstan by lead, the development of approaches to reduce environmental risks. *VI International Scientific-Practical Conference «Heavy Metals and Radionuclides in the Environment»*, p. 230-233 (in Russian)]

Кретович В.Л. (1986) Биохимия растений. М., Наука, 504 с. [Kretovich V.L. (1986) *Biochemistry of plants*. Moscow, Nauka, 504 p. (in Russian)]

Кукреш С.П., Ходянкova С.Ф. (2002) Повышение урожайности и качества льна-долгунца. *Текстильный вестник*, с. 24-28 [Kukresh S.P., Khodyankova S.F. (2002) Enhancing productivity and quality of long-fibred flax. *Textile Bulletin*, p. 24-28 (in Russian)]

Кулаева О.Н., Бурханова Э.А., Федина А.Б. (1989) Брассиностероиды в регуляции синтеза белка в листьях пшеницы. Доклады АН СССР, 305(5): 1277-1279 [Kulaeva O.N., Burkhanova E.A., Fedina A.B. (1989) Brassinosteroids in the regulation of protein synthesis in wheat leaves. *Reports of the USSR Academy of Sciences [Doklady AN SSSR]*, 305(5): 1277-1279 (in Russian)]

Лукаткин А.С., Лукаткин А.А. (2017) Повышение устойчивости сельскохозяйственных растений к абиотическим стрессорам обработкой экзогенными регуляторами роста. Материалы международной научно-практической конференции. Агрехимикаты в XXI веке: теория и практика применения, с. 69 [Lukatkin A.S., Lukatkin A.A. (2017) Increasing the resistance of agricultural plants to abiotic stressors by treatment with exogenous growth regulators. *Proceedings of the International Scientific-Practical Conference. Agrochemicals in the XXI Century: Theory and Practice of Application*, p. 69 (in Russian)]

Муромцев Г.С., Чкаников Д.Н., Кулаева О.Н., Гамбург К.З. (1987) Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. М., Агропромиздат, 383 с. [Muromtsev G.S., Chkanikov D.N., Kulaeva O.N., Hamburg K.Z. (1987) *Fundamentals of chemical regulation of plant growth and productivity*. Moscow, Agropromizdat, 383 p. (in Russian)]

Немерешина О.Н., Гусев Н.Ф., Филиппова А.В. (2013) Содержание водорастворимых антиоксидантов и микроэлементов в образцах чая. Успехи современного естествознания, 11: 54-64 [Nemereshina O.N., Gusev N.F., Filippova A.V. (2013) Contents water-soluble antioxidants

and trace elements in tea samples. *Advances in Current Natural Sciences* [Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya], 11: 54-64 (in Russian)]

Немерешина О.Н., Гусев Н.Ф., Чуклова Н.В., Трубников В.В. (2011) Особенности накопления эссенциальных и токсических элементов в надземной части *Linaria vulgaris* L. на шламовом поле криолитового производства. *Вестник Оренбургского государственного университета*, 12(131): 222-224 [Nemereshina O.N., Gusev N.F., Chuklova N.V., Trubnikov V.V. (2011) Contents essential elements in the grass *Linaria vulgaris* L. in the field cryolite plant sludge. *Vestnik of the Orenburg State University* [Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta], 12(131): 222-224 (in Russian)]

Озолина Н.В., Прадедова Е.В., Сапега Ю.Г., Павловская О.С., Салаяев Р.К. (2007) Влияние обработок фитогормонами на биомассу и накопление сахаров в корнеплодах столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Агрехимия*, 1: 47-51 [Ozolina N.V., Pradedova E.V., Sapega Yu.G., Pavlovskaya O.S., Salyaev R.K. (2007) The effect of phytohormone treatments on biomass and sugar accumulation in table beet roots (*Beta vulgaris* L.). *Agrochemistry* [Agrokhimiya], 1: 47-51 (in Russian)]

Покровская С.Ф. (1995) *Регулирование поведения свинца и кадмия в системе почва – растение*. М., Наука, 51 с. [Pokrovskaya S.F. (1995) *Regulation of the behavior of lead and cadmium in the soil – plant system*. Moscow, Nauka, 51 p. (in Russian)]

Пономаренко С.П. (1999) *Регуляторы роста растений на основе N-оксидов производных пиридина (физико-химические свойства и биологическая активность)*. Киев, Техника, 270 с. [Ponomarenko S.P. (1999) *Plant growth regulators based on n-oxides of pyridine derivatives (physicochemical properties and biological activity)*. Kiev, Technika, 270 p. (in Russian)]

Попова М.П. (2001) Полиоксистероиды (экти- и брассиностероиды) – регуляторы роста и повышения продуктивности картофеля. *Тезисы докладов конференции молодых ученых СО РАН, посвященной М.А. Лаврентьеву*, с. 35-36 [Popova M.P. (2001) Polyoxysteroids (ecdi- and brassinosteroids) – regulators of growth and increase in productivity of potatoes. *Abstracts of the Reports of the Conference of Young Scientists of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences Dedicated to M.A. Lavrentiev*, p. 35-36 (in Russian)]

Прадедова Е.В. (2001) Влияние эпибрассинолида на активность  $H^+$ -АТФазы и  $H^+$ -пирофосфатазы тонопласта корнеплода столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Тезисы докладов конференции молодых ученых СО РАН, посвященной М.А. Лаврентьеву*, с. 51-52 [Pradedova E.V. (2001) Effect of epibrassinolide on the activity of  $H^+$ -ATPase and  $H^+$ -pyrophosphatase of the tonoplast of beet edible root (*Beta vulgaris* L.). *Abstracts of the Reports of the Conference of Young Scientists of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences Dedicated to M.A. Lavrentiev*, p. 51-52 (in Russian)]

Прусакова Л.Д., Чижова С.И. (2005) Применение брассиностероидов в экстремальных для растений условиях. *Агрехимия*, 7: 87-94 [Prusakova L.D., Chizhova S.I. (2005) Application of brassinosteroids in extreme conditions for plants. *Agrochemistry* [Agrokhimiya], 7: 87-94 (in Russian)]

Пустовойтова Т.Н. (1990) Роль фитогормонов в засухоустойчивости. *Физиология растений*, 2: 110 [Pustovoitova T.N. (1990) The role of phytohormones in drought resistance. *Plant Physiology* [Fiziologiya rastenii], 2: 110 (in Russian)]

Реутова Н.В., Шевченко В.А. (1992) Мутагенное действие неорганических соединений серебра и свинца на традесканцию. *Генетика*, 28(9): 89-96 [Reutova N.V., Shevchenko V.A. (1992)

Mutagenic effect of inorganic silver and lead compounds on *Tradescantia*. *Genetics* [Genetika], 28(9): 89-96 (in Russian)]

Сафронова Н.М., Бабенко О.Н. (2008) Действие регуляторов роста на проростки яровой пшеницы при водном стрессе. *Вестник Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева*, 6(67): 83-90 [Safronova N.M., Babenko O.N. (2008) Effect of growth regulators on seedlings of spring wheat under water stress. *Bulletin of L.N. Gumilev Eurasian National University* [Vestnik Evraziiskogo natsional'nogo universiteta im. L.N. Gumilyova], 6(67): 83-90 (in Russian)]

Серегин И.В., Иванов В.Б. (1998) Передвижение ионов кадмия и свинца по тканям корня. *Физиология растений*, 45(6): 899-905 [Seregin I.V., Ivanov V.B. (1998) Movement of cadmium and lead ions through root tissues. *Plant Physiology* [Fiziologiya rastenii], 45(6): 899-905 (in Russian)]

Сперанская О. (2008) *Обзор проблемы загрязнения кадмием, свинцом и ртутью окружающей среды в России и Украине*. М., Центр «Эко-Согласие», 60 с. [Speranskaya O. (2008) *Review of the problem of environmental pollution with cadmium, lead and mercury in Russia and Ukraine*. М., Center «Eco-Soglasie», 60 p. (in Russian)]

Спитковский Д.М., Ермаков А.В., Горин А.И., Поспехова Н.И., Сорокина Т.А., Талызина Т.А. (1994) Особенности внепланового синтеза ДНК и изменений структурных параметров ядер лимфоцитов человека после действия рентгеновского излучения в малых дозах и в сочетании с УФ-облучением. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 34(1): 23-31 [Spitkovskiy D.M., Ermakov A.V., Gorin A.I., Pospekhova N.I., Sorokinna T.A., Talyzina T.A. (1994) The characteristics of unscheduled DNA synthesis and of the changes in the structural parameters of human lymphocyte nuclei after the action of X-ray radiation in low doses and in combination with UV irradiation. *Radiation Biology. Radioecology* [Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya], 34(1): 23-31 (in Russian)]

Спринчак Д.В. (2004) *Детоксикация тяжелых металлов (свинца, кадмия) в системе «почва – растение – животное»*. Красноярск, Красноярский государственный аграрный университет, 119 с. [Sprinchak D.V. (2004) *Detoxification of heavy metals (lead, cadmium) in the «soil – plant – animal» system*. Krasnoyarsk, Krasnoyarsk State Agrarian University, 119 p. (in Russian)]

Стрельцова В.А., Ольховик В.К. (1990) Влияние природных и синтетических брассиностероидов на урожай ячменя. *Доклады ВАСХНИЛ*, 6: 7 [Streltsova V.A., Olkhovik V.K. (1990) Effect of natural and synthetic brassinosteroids on barley harvest. *Reports of Lenin All-Union Academy of Agricultural Sciences* [Doklady VASKHNIL], 6: 7 (in Russian)]

Сынзыныс Б.И., Тянтова Е.Н., Момот О.А., Козьмин Г.В. (2005) *Техногенный риск и методология его оценки*. Обнинск, 76 с. [Synzynys B.I., Tiantova E.N., Momot O.A., Kozmin G.V. (2005) *Technogenic risk and methodology for its assessment*. Obninsk, 76 p. (in Russian)]

Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. (2014) *Тяжелые металлы и растения*. Петрозаводск, Карельский научный центр РАН, 194 с. [Titov A.F., Kaznina N.M., Talanova V.V. (2014) *Heavy metals and plants*. Petrozavodsk, Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 194 p. (in Russian)]

Титов В.Н., Смыслов Д.Г., Дмитриева Г.А., Болотова О.И. (2011) Регуляторы роста растений как биологический фактор снижения уровня тяжелых металлов в растении. *Вестник Орловского государственного аграрного университета*, 4(31): 4-6 [Titov V.N., Smyslov D.G., Dmitrieva G.A., Bolotova O.I. (2011) Plant growth regulators as a biological factor in reducing the

level of heavy metals in a plant. *Bulletin of the Orel State Agrarian University* [Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta], 4(31): 4-6 (in Russian)]

Тищенко С.Ю., Карначук Р.А., Хрипач В.А. (2001a) Участие эпибрасинолида в фоторегуляции роста и гормонального баланса арабидопсиса на синем свете. *Вестник Башкирского университета*, 2: 166-167 [Tishchenko S.Yu., Karnachuk R.A., Khripach V.A. (2001a) Involvement of epibrassinolide in photoregulation of growth and hormonal balance of arabidopsis in blue light. *Bulletin of Bashkir University* [Vestnik Bashkirskogo universiteta], 2: 166-167 (in Russian)]

Тищенко С.Ю., Карначук Р.А., Хрипач В.А. (2001b) Брассиностероиды и свет как факторы регуляции роста растений. *Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке*, с. 349-350 [Tishchenko S.Yu., Karnachuk R.A., Khripach V.A. (2001b) Brassinosteroids and light as factors regulating plant growth. *Current Issues of Plant Ecological Physiology in the XXI Century*, p. 349-350 (in Russian)]

Шаповал О.А., Можарова И.П., Коршунов А.А. (2014) Регуляторы роста растений в агротехнологиях. *Защита и карантин растений*, 6: 16-20 [Shapoval O.A., Mozharova I.P., Korshunov A.A. (2014) Plant growth regulators in agrotechnologies. *Plant Protection and Quarantine* [Zashchita i karantin rastenii], 6: 16-20 (in Russian)]

Ягодин Б.А., Смирнов П.М., Петербургский А.В. (1989) *Агрoхимия*. Ягодин Б.А. (ред.) М., Агропромиздат, 639 с. [Yagodin B.A., Smirnov P.M., Peterburgskii A.V. (1989) *Agrochemistry*. Yagodin B.A. (ed.) Moscow, Agropromizdat, 639 p. (in Russian)]

Ягодин Б.А., Жуков Ю.П., Кобзаренко В.И. (2002) *Агрoхимия*. М., Колос, 584 с. [Yagodin B.A., Zhukov Y.P., Kobzarenko V.I. (2002) *Agrochemistry*. Moscow, Kolos, 584 p. (in Russian)]

Яхин О.И., Лубянов А.А., Серегин И.В., Яхин И.А. (2014) Влияние регуляторов роста на накопление тяжелых металлов и проявление их токсического действия у высших растений. *Агрoхимия*, 12: 61-78 [Yakhin O.I., Lubyanov A.A., Seregin I.V., Yakhin I.A. (2014) Effect of plant growth regulators on the accumulation of heavy metals and their toxic action in higher plants. *Agrochemistry* [Agrohimiya], 12: 61-78 (in Russian)]

Abe H. (1989) Advances in brassinosteroid research and prospects for its agricultural application. *Japan Pesticide Information*, 55: 10-14

Abe H., Morishita T., Uchiyama M., Takatsuto S., Ikekawa N. (1984) A new brassinolide-related steroid in the leaves of *Thea sinensis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(8): 2171-2172

Absalon D., Ślesak B. (2010) The effects of changes in cadmium and lead air pollution on cancer incidence in children. *Science of the Total Environment*, 408(20): 4420-4428

Achard P., Vriegen W.H., Van Der Straeten D., Harberd N.P. (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell*, 15(12): 2816-2825

Alazem M., Lin N.-S. (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 16(5): 529-540

Albrecht C., Boutrot F., Segonzac C., Schwessinger B., Gimenez-Ibanez S., Chinchilla D., Rathjen J.P., de Vries S.C., Zipfel C. (2012) Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1): 303-308

- Ali B. (2017) Practical applications of brassinosteroids in horticulture – some field perspectives. *Scientia Horticulturae*, 225: 15-21
- Ali B., Hasan S.A., Hayat S., Hayat Q., Yadav S., Fariduddin Q., Ahmad A. (2008) A role of brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Environmental and Experimental Botany*, 62(2): 153-159
- Ali B., Hayat S., Ahmad A. (2007) 28-homobrassinolide ameliorates the saline stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 59(2): 217-223
- Allagulova C.R., Maslennikova D.R., Avalbaev A.M., Fedorova K.A., Yuldashev R.A., Shakirova F.M. (2015) Influence of 24-epibrassinolide on growth of wheat plants and the content of dehydrins under cadmium stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(4): 465-471
- An F., Zhang X., Zhu Z., Ji Y., He W., Jiang Z., Li M., Guo H. (2012) Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Cell Research*, 22(5): 915-927
- Bai M.Y., Shang J.X., Oh E., Fan M., Bai Y., Zentella R., Sun T.P., Wang Z.Y. (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology*, 14(8): 810-U78
- Bai Y., Laenen A., Haufroid V., Nawrot T.S., Nemery B. (2019) Urinary lead in relation to combustion-derived air pollution in urban environments. A longitudinal study of an international panel. *Environment International*, 125: 75-81
- Bajguz A. (2000) Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(10): 797-801
- Bajguz A. (2009) Brassinosteroid enhanced the level of abscisic acid in *Chlorella vulgaris* subjected to short-term heat stress. *Journal of Plant Physiology*, 166(8): 882-886
- Bajguz A., Hayat S. (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1): 1-8
- Bao F., Shen J.J., Brady S.R., Muday G.K., Asami T., Yang Z.B. (2004) Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(4): 1624-1631
- Bechtold U., Field B. (2018) Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 69(11): 2753-2758
- Belkhadir Y., Jaillais Y. (2015) The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytologist*, 206(2): 522-540
- Bhattacharya A. (2019) Chapter 6 – Effect of high-temperature stress on the metabolism of plant growth regulators. *Effect of high temperature on crop productivity and metabolism of macro molecules*. Bhattacharya A. (ed.) Cambridge, Massachusetts, Academic Press, p. 485-591
- Bishop G.J., Yokota T. (2001) Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant and Cell Physiology*, 42(2): 114-120
- Boerjan W., Cervera M.T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Van Onckelen H., Van Montagu M., Inzé D. (1995) Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell*, 7(9): 1405-1419
- Budaj S.I. (2000) Germinating capacity and morphophysiological peculiarities of developing carrot plants under treatment by growth regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

of Belarus. *Biological Series* [Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk], 3: 38-41

Cai J.H., Luo F., Zhao Y.B., Zhou Q., Wei B.D., Zhou X., Ji S.J. (2019) 24-epibrassinolide treatment regulates broccoli yellowing during shelf life. *Postharvest Biology and Technology*, 154: 87-95

Campbell P., Braam J. (1998) Co- and/or post-translational modifications are critical for *TCH4* XET activity. *Plant Journal*, 15(4): 553-561

Cano-Delgado A., Yin Y.H., Yu C., Vafeados D., Mora-Garcia S., Cheng J.C., Nam K.H., Li J.M., Chory J. (2004) *BRL1* and *BRL3* are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development*, 131(21): 5341-5351

Cano-Delgado A.I., Blazquez M.A. (2013) Spatial control of plant steroid signaling. *Trends in Plant Science*, 18(5): 235-236

Cheshmazar E., Arfaeinia H., Karimyan K., Sharafi H., Hashemi S.E. (2018) Dataset for effect comparison of irrigation by wastewater and ground water on amount of heavy metals in soil and vegetables: Accumulation, transfer factor and health risk assessment. *Data in Brief*, 18: 1702-1710

Choe S., Dilkes B.P., Gregory B.D., Ross A.S., Yuan H., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Tanaka A., Yoshida S., Tax F.E., Feldmann K.A. (1999) The Arabidopsis dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology*, 119(3): 897-907

Clemens S., Palmgren M.G., Krämer U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, 7(7): 309-315

Clouse S.D. (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell*, 23(4): 1219-1230

Clouse S.D., Langford M., McMorris T.C. (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology*, 111(3): 671-678

Clouse S.D., Sasse J.M. (1998) Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 427-451

Dahse I., Sack H., Bernstein M., Petzold U., Müller E., Vorbrodt H.M., Adam G. (1990) Effects of (22S, 23S)-homobrassinolide and related compounds on membrane potential and transport of *Egeria* leaf cells. *Plant Physiology*, 93(3): 1268-1271

Davies P.J. (2004) *Plant hormones biosynthesis, signal transduction action*. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publisher, 750 p.

De Bruyne L., Höfte M., De Vleeschauwer D. (2014) Connecting growth and defense: the emerging roles of brassinosteroids and gibberellins in plant innate immunity. *Molecular Plant*, 7(6): 943-959

De Grauwe L., Vandenbussche F., Tietz O., Palme K., Van Der Straeten D. (2005) Auxin, ethylene and brassinosteroids: Tripartite control of growth in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Plant and Cell Physiology*, 46(6): 827-836

Deng X.-G., Zhu T., Zou L.-J., Han X.Y., Zhou X., Xi D.H., Zhang D.W., Lin H.H. (2016) Orchestration of hydrogen peroxide and nitric oxide in brassinosteroid-mediated systemic virus resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal*, 85(4): 478-493

Fabregas N., Lozano-Elena F., Blasco-Escamez D., Tohge T., Martinez-Andujar C., Albacete A., Osorio S., Bustamante M., Riechmann J.L., Nomura T., Yokota T., Conesa A., Pérez

Alfocea F., Fernie A.R., Cano-Delgado A.I. (2018) Overexpression of the vascular brassinosteroid receptor *BRL3* confers drought resistance without penalizing plant growth. *Nature Communications*, 9: 4680

Fan Y., Li H., Xue Z., Zhang Q., Cheng F. (2017) Accumulation characteristics and potential risk of heavy metals in soil-vegetable system under greenhouse cultivation condition in Northern China. *Ecological Engineering*, 102: 367-373

Fang P.P., Yan M.Y., Chi C., Wang M.Q., Zhou Y.H., Zhou J., Shi K., Xia X.J., Foyer C.H., Yu J.Q. (2019) Brassinosteroids act as a positive regulator of photoprotection in response to chilling stress. *Plant Physiology*, 180(4): 2061-2076

Fariduddin Q., Yusuf M., Ahmad I., Ahmad A. (2014) Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum*, 58(1): 9-17

Feng W., Lindner H., Robbins N.E., Dinneny J.R. (2016) Growing out of stress: the role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *Plant Cell*, 28(8): 1769-1782

Filek M., Rudolphi-Skórska E., Sieprawska A., Kvasnica M., Janeczko A. (2017) Regulation of the membrane structure by brassinosteroids and progesterone in winter wheat seedlings exposed to low temperature. *Steroids*, 128: 37-45

Forgac M. (1998) Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *FEBS Letters*, 440(3): 258-263

Foroughi M., Venter F., Teicher K. (1982) Experimentelle ermittlung der schwermetallanreicherung und verteilung in buschbohnen (*Phaseolus vulgaris* L.). *Landwirtschaftliche Forschung*, 32(38): 239-248 (in German)

Fu J., Sun P., Luo Y., Zhou H., Gao J., Zhao D., Pubu Z., Liu J., Hu T. (2019) Brassinosteroids enhance cold tolerance in *Elymus nutans* via mediating redox homeostasis and proline biosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 167: 103831

Fujioka S., Choi Y.H., Takatsuto S., Yokota T., Li J.M., Chory J., Sakurai A. (1996) Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, typhasterol and 6-deoxytyphasterol from the shoots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 37(8): 1201-1203

Fujioka S., Sakurai A. (1997) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiologia Plantarum*, 100(3): 710-715

Gardener H., Bowen J., Callan S.P. (2019) Lead and cadmium contamination in a large sample of United States infant formulas and baby foods. *Science of the Total Environment*, 651(1): 822-827

Gichner T., Žnidar I., Száková J. (2008) Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 652(2): 186-190

Glyan'ko A.K. (2018) Phytohormones and morphogenesis of root nodules and lateral roots of a legume plant. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 14(3): 12-26

Gomes M.M.A., Campostrini E., Leal N.R., Viana A.P., Ferraz T.M., Siqueira L.N., Rosa R.C.C., Netto A.T., Nuñez-Vázquez M., Zullo M.A.T. (2006) Brassinosteroid analogue effects on the yield of yellow passion fruit plants (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *Scientia Horticulturae*, 110(3): 235-240

Gonzalez-Garcia M.P., Vilarrasa-Blasi J., Zhiponova M., Divol F., Mora-Garcia S., Russinova E., Cano-Delgado A.I. (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development*, 138(5): 849-859

Grove M.D., Spencer G.F., Rohwedder W.K., Mandava N., Worley J.F., Warthen J.D., Steffens G.L., Flippen-Anderson J.L., Cook J.C. (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, 281(5728): 216-217

Hallgren J.E., Gezelius K. (1982) Effect of SO<sub>2</sub> on photosynthesis and ribulose biphosphate carboxylase in pine tree seedlings. *Physiologia Plantarum*, 54(2): 153-161

Hartwig A., Schlepegrell R., Beyersmann D. (1990) Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, 241(1): 75-82

Hassan A., Hassan Abou El Wafa M. (1947) An oestrogenic substance in pollen-grains of date palm tree *Phoenix dactylifera* L., Palmae. *Nature*, 159(4038): 409-410

Hayat S., Alyemeni M.N., Hasan S.A. (2012) Foliar spray of brassinosteroid enhances yield and quality of *Solanum lycopersicum* under cadmium stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3): 325-335

He J., Wang Y.J., Ding H.D., Ge C.L. (2016) Epibrassinolide confers zinc stress tolerance by regulating antioxidant enzyme responses, osmolytes, and hormonal balance in *Solanum melongena* seedlings. *Brazilian Journal of Botany*, 39(1): 295-303

Hertzberg R.C., Mac Donell M.M. (2002) Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Science of the Total Environment*, 288(1-2): 31-42

Hothorn M., Belkhadir Y., Dreux M., Dabi T., Noel J.P., Wilson I.A., Chory J. (2011) Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase *BR11*. *Nature*, 474(7352): 467-471

Ikekawa N., Zhao Y.J. (1991) Application of 24-epibrassinolide in agriculture. *ACS Symposium Series*, 474: 280-291

Iliev E.A., Xu W., Polisenky D.H., Oh M.H., Torisky R.S., Clouse S.D., Braam J. (2002) Transcriptional and posttranscriptional regulation of Arabidopsis *TCH4* expression by diverse stimuli. Roles of cis regions and brassinosteroids. *Plant Physiology*, 130(2): 770-783

Iwasaki T., Shibaoka H. (1991) Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated *Zinnia* mesophyll-cells. *Plant and Cell Physiology*, 32(7): 1007-1014

Janeczko A., Koscielniak J., Pilipowicz M., Szarek-Lukaszewska G., Skoczowski A. (2005) Protection of winter rape photosystem 2 by 24-epibrassinolide under cadmium stress. *Photosynthetica*, 43(2): 293-298

Janeczko A., Pocięcha E., Dziurka M., Jurczyk B., Libik-Konieczny M., Oklestkova J., Novák O., Pilarska M., Filek M., Rudolphi-Skórska E., Sadura I., Siwek A. (2019) Changes in content of steroid regulators during cold hardening of winter wheat – Steroid physiological/biochemical activity and impact on frost tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139: 215-228

Järup L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167-182

Jiang Y.P., Huang L.F., Cheng F., Zhou Y.H., Xia X.J., Mao W.H., Shi K., Yu J.Q. (2013) Brassinosteroids accelerate recovery of photosynthetic apparatus from cold stress by balancing the electron partitioning, carboxylation and redox homeostasis in cucumber. *Physiologia Plantarum*, 148(1): 133-145

Jones T.K., Roddick J.G. (1977) Effects of steroidal estrogens and gibberellic acid on stem elongation in tall and dwarf cultivars of *Pisum sativum*. *New Phytologist*, 79(3): 493-499

Kabashnikova L.F., Klimovich A.S., Ling S.S., Mikhailova S.A., Chaika M.T., Shanbanovich G.N. (1998) Peculiarities of spring barley development by treating seeds with physiologically active



substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series* [Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk], 1: 67-72

Kagale S., Divi U.K., Krochko J.E., Keller W.A., Krishna P. (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta*, 225(2): 353-364

Kang J.G., Yun J., Kim D.H., Chung K.S., Fujioka S., Kim J.I., Dae H.W., Yoshida S., Takatsuto S., Song P.S., Park C.M. (2001) Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small g protein in etiolated seedling growth. *Cell*, 105(5): 625-636

Kaur S., Bhardwaj R. (2003) Brassinosteroids regulated heavy metals uptake in *Brassica campestris* L. *Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists «Plant Biology 2003»*. Honolulu, p. 628

Khripach V., Zhabinskii V., de Groot A. (2000) Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany*, 86(3): 441-447

Kim B.H., Kim S.Y., Nam K.H. (2012) Genes encoding plant-specific class III peroxidases are responsible for increased cold tolerance of the brassinosteroid-insensitive 1 mutant. *Molecules and Cells*, 34(6): 539-548

Kim S.Y., Warpeha K.M., Huber S.C. (2019) The brassinosteroid receptor kinase, *BR1*, plays a role in seed germination and the release of dormancy by cold stratification. *Journal of Plant Physiology*, 241: UNSP 153031

Kohli S.K., Handa N., Sharma A., Gautam V., Arora S., Bhardwaj R., Alyemeni M.N., Wijaya L., Ahmad P. (2018) Combined effect of 24-epibrassinolide and salicylic acid mitigates lead (Pb) toxicity by modulating various metabolites in *Brassica juncea* L. seedlings. *Protoplasma*, 255(1): 11-24

Kopcewicz J. (1971) Influence of steroidal hormones on flower sex expression in *Ecballium elaterium* (L.). *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 65: 92-94

Kopcewicz J., Rogozinska J.H. (1972) Effect of estrogens and gibberellic acid on cytokinin and abscisic acid-like compound contents in pea. *Experientia*, 28(12): 1516-1517

Kopcewicz J., Zatorska Z., Kulikowska H., Szczesniak T. (1977) Endogenous growth-regulators in embryonic shoots of scots pine at time of male and female flower primordia initiation. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 46(1): 119-128

LeGalley E., Widom E., Krekeler M.P.S., Kuentz D.C. (2013) Chemical and lead isotope constraints on sources of metal pollution in street sediment and lichens in southwest Ohio. *Applied Geochemistry*, 32: 195-203

Lehman A., Black R., Ecker J.R. (1996) *HOOKLESS1*, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Cell*, 85(2): 183-194

Li H., Johnson P., Stepanova A., Alonso J.M., Ecker J.R. (2004) Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 7(2): 193-204

Li J. (2010) Regulation of the nuclear activities of brassinosteroid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5): 540-547

Li J., Chory J. (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90(5): 929-938

Li J., Nam K.H. (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a *GSK3/SHAGGY*-like kinase. *Science*, 295(5558): 1299-1301

- Li J., Wen J., Lease K.A., Doke J.T., Tax F.E., Walker J.C. (2002) *BAK1*, an Arabidopsis *LRR* receptor-like protein kinase, interacts with *BR11* and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(2): 213-222
- Li L., van Staden J. (1998) Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulation*, 24(1): 55-66
- Li Q.F., He J.X. (2016) *BZR1* Interacts with *HY5* to mediate brassinosteroid- and light-regulated cotyledon opening in Arabidopsis in darkness. *Molecular Plant*, 9(1): 113-125
- Li X., Zhang Y., Tan M., Liu J., Bao L., Zhang G., Li Y., Iida A. (2009) Atmospheric lead pollution in fine particulate matter in Shanghai, China. *Journal of Environmental Sciences*, 21(8): 1118-1124
- Lima J.V., Lobato A.K.S. (2017) Brassinosteroids improve photosystem II efficiency, gas exchange, antioxidant enzymes and growth of cowpea plants exposed to water deficit. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(1): 59-72
- Liu G., Yu Y., Hou J., Xue W., Liu X., Liu Y., Wang W., Alsaedi A., Hayat T., Liu Z. (2014) An ecological risk assessment of heavy metal pollution of the agricultural ecosystem near a lead-acid battery factory. *Ecological Indicators*, 47: 210-218
- Liu W., Zhou Q., Zhang Y., Wei S. (2010) Lead accumulation in different Chinese cabbage cultivars and screening for pollution-safe cultivars. *Journal of Environmental Management*, 91(3): 781-788
- Love A., Love D. (1945) Experiments on the effects of animal sex hormones on dioecious plants. *Arkiv for Botanik*, 32A: 1-60
- Lozano-Duran R., Zipfel C. (2015) Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends in Plant Science*, 20(1): 12-19
- Maret W. (2017) The bioinorganic chemistry of lead in the context of its toxicity. *Lead: Its Effects on Environment and Health*. Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. (eds.) Berlin, Walter de Gruyter GmbH & Co KG, p. 1-20
- Miransari M., Smith D.L. (2014) Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 110-121
- Mora-Garcia S., Vert G., Yin Y., Cano-Delgado A., Cheong H., Chory J. (2004) Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Genes & Development*, 18(4): 448-460
- Muzychenko I., Jamalova G., Mussina U., Kazulis V., Blumberga D. (2017) Case study of lead pollution in the roads of Almaty. *Energy Procedia*, 113: 369-376
- Nakamura A., Higuchi K., Goda H., Fujiwara M.T., Sawa S., Koshiba T., Shimada Y., Yoshida S. (2003) Brassinolide induces *IAA5*, *IAA19*, and *DR5*, a synthetic auxin response element in *Arabidopsis*, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiology*, 133(4): 1843-1853
- Nam K.H., Li J. (2002) *BR11/BAK1*, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(2): 203-212
- Nie S., Huang S., Wang S., Mao Y., Liu J., Ma R., Wang X. (2019) Enhanced brassinosteroid signaling intensity via *S1BR11* overexpression negatively regulates drought resistance in a manner opposite of that via exogenous *BR* application in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138: 36-47
- Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Tax F.E., Yoshida S., Feldmann K.A. (2000) Biosynthetic pathways of brassinolide in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(1): 201-209
- Nolan T., Chen J., Yin Y. (2017) Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses. *Biochemical Journal*, 474(16): 2641-2661

- O'Connor D., Hou D., Ye J., Zhang Y., Ok Y.S., Song Y., Coulon F., Peng T., Tian L. (2018) Lead-based paint remains a major public health concern: A critical review of global production, trade, use, exposure, health risk, and implications. *Environment International*, 121(1): 85-101
- Obiora S.C., Chukwu A., Chibuikwe G., Nwegbu A.N. (2019) Potentially harmful elements and their health implications in cultivable soils and food crops around lead-zinc mines in Ishiagu, Southeastern Nigeria. *Journal of Geochemical Exploration*, 204: 289-296
- Oh M.H., Romanow W.G., Smith R.C., Sasse J., Clouse S.D. (1996) *BRUI* encodes a xyloglucan endo-transglycosylase that is expressed in inner and outer tissues of elongating soybean epicotyls. *Plant Physiology*, 111(2): 482-482
- Oh M.H., Romanow W.G., Smith R.C., Zamski E., Sasse J., Clouse S.D. (1998) Soybean *BRUI* encodes a functional xyloglucan endotransglycosylase that is highly expressed in inner epicotyl tissues during brassinosteroid-promoted elongation. *Plant and Cell Physiology*, 39(1): 124-130
- Park K.H., Park J.D., Hyun K.H., Nakayama M., Yokota T. (1994) Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroid-like activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *Perilla frutescens* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(12): 2241-2243
- Parmoon G., Ebadi A., Jahanbakhsh S., Hashemi M. (2019) Physiological response of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) to drought stress and plant growth regulators. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66(5): 795-805
- Planas-Riverola A., Gupta A., Betegon-Putze I., Bosch N., Ibanes M., Cano-Delgado A.I. (2019) Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*, 146(5): UNSP dev151894
- Pociecha E., Jurczyk B., Dziurka M., Paczyński R., Oklešťková J., Janeczko A. (2015) 24-Epibrassinolide promotes carbohydrates accumulation in crowns of perennial ryegrass during cold acclimation by regulation of gene expression and enzyme activities which results in increased frost tolerance. *Procedia Environmental Sciences*, 29: 234-235
- Pourrut B., Jean S., Silvestre J., Pinelli E. (2011) Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: Potential involvement of oxidative stress. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2): 123-128
- Pragst F., Stieglitz K., Runge H., Runow K.D., Quig D., Osborne R., Runge C., Arika J. (2017) High concentrations of lead and barium in hair of the rural population caused by water pollution in the Thar Jath oilfields in South Sudan. *Forensic Science International*, 274: 99-106
- Pugachov R.M., Matveev V.A., Skorina V.V. (2000) Influence of mineral and hormonal composition of nutrient medium on prune, cherry plum and sloe embryos germination and growing in vitro. *Sodininkystė ir Daržininkystė*, 19(3): 454-463
- Rao S.S.R., Raghu K. (2017) Effect of 24-epibrassinolide on growth and metabolism of rose-scented geranium [*Pelargonium graveolens* (L.) Herit] under cadmium toxicity. *International Journal of Botany Studies*, 2(4): 54-59
- Raz V., Ecker J.R. (1999) Regulation of differential growth in the apical hook of *Arabidopsis*. *Development*, 126(16): 3661-3668
- Reichmayr-Lais A.M., Kurchgessner M. (1984) Lead. *Biochemistry of the essential ultratrace elements*. Frieden E. (ed.) New York – London, Plenum Press, p. 367-387

- Rout G.R., Das P. (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, 23(1): 3-11
- Saibo N.J.M., Vriezen W.H., Beemster G.T.S., Van Der Straeten D. (2003) Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant Journal*, 33(6): 989-1000
- Sairam R.K. (1994) Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regulation*, 14(2): 173-181
- Sakurai A., Yokota T., Clouse S.D. (1999) *Brassinosteroids: steroidal plant hormones*. Tokyo, Springer, 264 p.
- Sasse J. (1999) Physiological actions of brassinosteroids. *Brassinosteroids: steroidal plant hormones*. Sakurai A., Yokota T., Clouse S.D. (eds.) Tokyo, Springer, p. 137-161
- Schneider J.A., Yoshihara K., Nakanishi K., Kato N. (1983) Typhasterol (2-deoxycastasterone) – a new plant-growth regulator from cat-tail pollen. *Tetrahedron Letters*, 24(36): 3859-3860
- Schwark A., Schierle J. (1992) Interaction of ethylene and auxin in the regulation of hook growth I: the role of auxin in different growing regions of the hypocotyl hook of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 140(5): 562-570
- Serna M., Hernández F., Coll F., Amorós A. (2012) Brassinosteroid analogues effect on yield and quality parameters of field-grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, 143: 29-37
- Sharma A., Thakur S., Kumar V., Kanwar M.K., Kesavan A.K., Thukral A.K., Bhardwaj R., Alam P., Ahmad P. (2016a) Pre-sowing seed treatment with 24-epibrassinolide ameliorates pesticide stress in *Brassica juncea* L. through the modulation of stress markers. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1569
- Sharma I., Bhardwaj R., Pati P.K. (2015) Exogenous application of 28-homobrassinolide modulates the dynamics of salt and pesticides induced stress responses in an elite rice variety Pusa Basmati-1. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(3): 509-518
- Sharma M., Mahajan P., Singh H.P., Batish D.R., Kohli R.K. (2019) 24-Epibrassinolide pre-treatment reduces alkaline-induced oxidative stress in red rice seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(22): 23192-23197
- Sharma P., Bhardwaj R. (2007) Effects of 24-epibrassinolide on growth and metal uptake in *Brassica juncea* L. under copper metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3): 259-263
- Sharma P., Kumar A., Bhardwaj R. (2016b) Plant steroidal hormone epibrassinolide regulate – Heavy metal stress tolerance in *Oryza sativa* L. by modulating antioxidant defense expression. *Environmental and Experimental Botany*, 122: 1-9
- She J., Han Z., Kim T.-W., Wang J., Cheng W., Chang J., Shi S., Wang J., Yang M., Wang Z.-Y., Chai J. (2011) Structural insight into brassinosteroid perception by *BR1*. *Nature*, 474(7352): 472-476
- Shigeta T., Zaizen Y., Sugimoto Y., Nakamura Y., Matsuo T., Okamoto S. (2015) Heat shock protein 90 acts in brassinosteroid signaling through interaction with BES1/BZR1 transcription factor. *Journal of Plant Physiology*, 178: 69-73
- Shimada Y., Goda H., Nakamura A., Takatsuto S., Fujioka S., Yoshida S. (2003) Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 131(1): 287-297

- Sihlahla M., Mouri H., Nomngongo P.N. (2019) Uptake of trace elements by vegetable plants grown on agricultural soils: Evaluation of trace metal accumulation and potential health risk. *Journal of African Earth Sciences*, 160: 103635
- Silk W.K., Erickson R.O. (1978) Kinematics of hypocotyl curvature. *American Journal of Botany*, 65(3): 310-319
- Singh A.P., Savaldi-Goldstein S. (2015) Growth control: brassinosteroid activity gets context. *Journal of Experimental Botany*, 66(4): 1123-1132
- Skarzynski B. (1933) An estrogenic substance from plant material. *Nature*, 131: 766
- Skerfving S., Bergdahl I.A. (2015) Chapter 43 – lead. *Handbook on the toxicology of metals. Volume II: Specific metals*. Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M. (eds.) Cambridge, Massachusetts, Academic Press, p. 911-967
- Small C.C., Degenhardt D. (2018) Plant growth regulators for enhancing revegetation success in reclamation: A review. *Ecological Engineering*, 118: 43-51
- Small C.C., Degenhardt D., McDonald T. (2019) Plant growth regulators for enhancing Alberta native grass and forb seed germination. *Ecological Engineering: X*, 1: 100003
- Smalle J., Haegman M., Kurepa J., Van Montagu M., Van Der Straeten D. (1997) Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6): 2756-2761
- Sonjaroon W., Jutamanee K., Khamsuk O., Thussagunpanit J., Kaveeta L., Suksamrarn A. (2018) Impact of brassinosteroid mimic on photosynthesis, carbohydrate content and rice seed set at reproductive stage under heat stress. *Agriculture and Natural Resources*, 52(3): 234-240
- Stepanova A.N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L.M., Xie D.Y., Dolezal K., Schlereth A., Jürgens G., Alonso J.M. (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, 133(1): 177-191
- Stevens T., Forgas M. (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13: 779-808
- Surgun-Acar Y., Zemheri-Navruz F. (2019) 24-Epibrassinolide promotes arsenic tolerance in *Arabidopsis thaliana* L. by altering stress responses at biochemical and molecular level. *Journal of Plant Physiology*, 238: 12-19
- Symons G.M., Reid J.B. (2004) Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiology*, 135(4): 2196-2206
- Tang W., Kim T.-W., Oses-Prieto J.A., Sun Y., Deng Z., Zhu S., Wang R., Burlingame A.L., Wang Z.-Y. (2008) BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase *BRII* in *Arabidopsis*. *Science*, 321(5888): 557-560
- Toyama S. (2000) Recent studies on brassinosteroids – With special regard to the growth physiology of crop plants. *Japanese Journal of Crop Science*, 69(4): 453-463
- Tran L.S., Pal S. (2014) *Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications*. New York, Springer-Verlag, 361 p.
- Tunc-Ozdemir M., Jones A.M. (2017) *BRL3* and *AtRGS1* cooperate to fine tune growth inhibition and ROS activation. *PLOS ONE*, 12(5): e0177400
- Vandenbussche F., Petrasek J., Zadnikova P., Hoyerova K., Pesek B., Raz V., Swarup R., Bennett M., Zazimalova E., Benkova E., Van Der Straeten D. (2010) The auxin influx carriers AUX1 and LAX3

are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development*, 137(4): 597-606

Vandenbussche F., Smalle J., Le J., Saibo N.J.M., De Paepe A., Chaerle L., Tietz O., Smets R., Laarhoven L.J.J., Harren F.J.M., Van Onckelen H., Palme K., Verbelen J.-P., Van Der Straeten D. (2003a) The *Arabidopsis* mutant *alh1* illustrates a cross talk between ethylene and auxin. *Plant Physiology*, 131(3): 1228-1238

Vandenbussche F., Van Der Straeten D. (2004) Shaping the shoot: a circuitry that integrates multiple signals. *Trends in Plant Science*, 9(10): 499-506

Vandenbussche F., Vriezen W.H., Smalle J., Laarhoven L.J.J., Harren F.J.M., Van Der Straeten D. (2003b) Ethylene and auxin control the *Arabidopsis* response to decreased light intensity. *Plant Physiology*, 133(2): 517-527

Venugopal B., Luckey T.D. (1978) *Metal toxicity in mammals: Chemical toxicity of metals and metalloids*. New York, London, Plenum Press, 409 p.

Verma V., Ravindran P., Kumar P.P. (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16: 86

Vert G., Nemhauser J.L., Geldner N., Hong F., Chory J. (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 177-201

Vriezen W.H., Achard P., Harberd N.P., Van Der Straeten D. (2004) Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings is gibberellin dependent. *Plant Journal*, 37(4): 505-516

Vukasinovic N., Russinova E. (2018) BRexit: possible brassinosteroid export and transport routes. *Trends in Plant Science*, 23(4): 285-292

Wang F.J., Zhang Y.T., Guo Q.X., Tan H.F., Han J.H., Lin H.R., Wei H.W., Xu G.W., Zhu C. (2018) Effects of exogenous 5-aminolevulinic acid and 24-epibrassinolide on Cd accumulation in rice from Cd-contaminated soil. *Rice Science*, 25(6): 320-329

Wang X., Chory J. (2006) Brassinosteroids regulate dissociation of *BKII*, a negative regulator of *BRII* signaling, from the plasma membrane. *Science*, 313(5790): 1118-1122

Wang Y.T., Chen Z.Y., Jiang Y., Duan B.B., Xi Z.M. (2019) Involvement of ABA and antioxidant system in brassinosteroid-induced water stress tolerance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 256: 108596

Wang Z.Y., Bai M.Y., Oh E., Zhu J.Y. (2012) Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annual Review of Genetics*, 46: 701-724

Wang, H., Yang C., Zhang C., Wang N., Lu D., Wang J., Zhang S., Wang Z.-X., Ma H., Wang X. (2011) Dual role of BKII and 14-3-3 s in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors. *Developmental Cell*, 21(5): 825-834

Watt M.P., Cresswell C.F. (1987) A comparison between the utilization of storage protein and exogenous nitrate during seedling establishment in *Zea mays* L. *Plant, Cell and Environment*, 10(4): 327-332

Wu C.C., Li F., Xu H., Zeng W.M., Yu R.L., Wu X.L., Shen L., Liu Y.D., Li J.K. (2019) The potential role of brassinosteroids (BRs) in alleviating antimony (Sb) stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141: 51-59

- Xia X.-J., Huang L.-F., Zhou Y.-H., Mao W.-H., Shi K., Wu J.-X., Asami T., Chen Z., Yu J.-Q. (2009) Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of Rubisco and expression of photosynthetic genes in *Cucumis sativus*. *Planta*, 230(6): 1185-1196
- Xu R.J., Guo Y.S., Zhao Y.J. (1990) Epibrassinolide-induced changes in the elongation, endogenous GA<sub>3</sub>, ABA and starch content of cucumber hypocotyls. *Acta Photophysiological Sinica*, 2: 27-29 (in Chinese, Summary in English)
- Yamagami A., Chieko S., Sakuta M., Shinozaki K., Osada H., Nakano A., Asami T., Nakano T. (2018) Brassinosteroids regulate vacuolar morphology in root meristem cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 13(4): e1417722
- Yamamoto R., Fujioka S., Iwamoto K., Demura T., Takatsuto S., Yoshida S., Fukuda H. (2007) Co-regulation of brassinosteroid biosynthesis-related genes during xylem cell differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 48(1): 74–83
- Yan Z., Zhao J., Peng P., Chihara R.K., Li J. (2009) *BIN2* functions redundantly with other Arabidopsis GSK3-like kinases to regulate brassinosteroid signaling. *Plant Physiology*, 150(2): 710-721
- Ye H., Liu S., Tang B., Chen J., Xie Z., Nolan T.M., Jiang H., Guo H., Lin H.-Y., Li L., Wang Y., Tong H., Zhang M., Chu C., Li Z., Aluru M., Aluru S., Schnable P.S., Yin Y. (2017) RD26 mediates crosstalk between drought and brassinosteroid signalling pathways. *Nature Communications*, 8(1): 14573
- Yin W.C., Dong N.N., Niu M., Zhang X.X., Li L.L., Liu J., Liu B., Tong H.N. (2019) Brassinosteroid-regulated plant growth and development and gene expression in soybean. *Crop Journal*, 7(3): 411-418
- Yokota T., Arima M., Takahashi N. (1982) Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency from chestnut insect gall. *Tetrahedron Letters*, 23(12): 1275-1278
- Yokota T., Ohnishi T., Shibata K., Asahina M., Nomura T., Fujita T., Ishizaki K., Kohchi T. (2017) Occurrence of brassinosteroids in non-flowering land plants, liverwort, moss, lycophyte and fern. *Phytochemistry*, 136: 46-55
- Yoshida T., Mogami J., Yamaguchi-Shinozaki K. (2014) ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 21: 133-139
- Yuan G.F., Jia C.G., Li Z., Sun B., Zhang L.P., Liu N., Wang Q.M. (2010) Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae*, 126(2): 103-108
- Zadnikova P., Petrasek J., Marhavy P., Raz V., Vandenbussche F., Ding Z., Schwarzerová K., Morita M.T., Tasaka M., Hejátko J., Van Der Straeten D., Friml J., Benková E. (2010) Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 137(4): 607-617
- Zhang H., Wei K., Zhang M., Liu R., Chen Y. (2014) Assessing the mechanism of DNA damage induced by lead through direct and indirect interactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 136: 46-53
- Zhao B., Li J. (2012) Regulation of brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(10): 746-759
- Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman J.R., Cohen J.D., Weigel D., Chory J. (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, 291(5502): 306-309

Zheng Y.X., Xu B., Ren K.L., Zhang Y.P., Wu J.C. (2017) Impact of soil drench and foliar spray of 24-epibrassinolide on the growth, yield, and quality of field-grown *Moringa oleifera* in Southwest China. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(4): 931-941

Zhou Y.L., Huo S.F., Wang L.T., Meng J.F., Zhang Z.W., Xi Z.M. (2018) Exogenous 24-epibrassinolide alleviates oxidative damage from copper stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130: 555-565

Zhu J.-Y., Sae-Seaw J., Wang Z.-Y. (2013) Brassinosteroid signalling. *Development*, 140(8): 1615-1620

Zhu Y., Wang B., Tang K., Hsu C.-C., Xie S., Du H., Yang Y., Tao W.A., Zhu J.-K. (2017) An *Arabidopsis* Nucleoporin NUP85 modulates plant responses to ABA and salt stress. *PLOS Genetics*, 13(12): e1007124

Zhu Z.G., Liang H.L., Chen G.P., Tang B.Y., Tian S.B., Hu Z.L. (2019) Isolation of the brassinosteroid receptor genes and recharacterization of dwarf plants by silencing of *SIBR11* in tomato. *Plant Growth Regulation*, 89(1): 59-71

Zou L.-J., Deng X.-G., Zhang L.-E., Zhu T., Tan W.-R., Muhammad A., Zhu L.-J., Zhang C., Zhang D.-W., Lin H.-H. (2018) Nitric oxide as a signaling molecule in brassinosteroid-mediated virus resistance to Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 163(2): 196-210

Zwarich M.A., Mills J.G. (1982) Heavy metal accumulation by some vegetable crops grown on sewage-sludge-amended soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 62(2): 243-247



DOI 10.17516/1997-1389-0316

УДК 579.6

## **Effect of Abscisic Acid on the Susceptibility of Wheat Leaves to Powdery Mildew *Blumeria graminis* f. sp. *tritici***

**Alexander V. Babosha\***

*N.V. Tsitsin Main Botanical Garden  
of the Russian Academy of Sciences  
Moscow, Russian Federation*

Received 30.04.2018, received in revised form 22.10.2018, accepted 30.01.2019, published online 30.04.2020

**Abstract.** Abscisic acid (ABA) plays an important role in the regulation of protective processes under stresses of various nature. In contrast to abiotic stresses, when a plant and a pathogen interact, this phytohormone is in most cases a negative regulator of resistance. However, even with a similar nature of pathogenesis, ABA can produce different effects. For example, ABA treatment in different experiments induced either a decrease or an increase in the susceptibility of cereals to powdery mildew. The aim of this work was to study the immunomodulatory properties of exogenous ABA depending on its concentration in the pathosystem composed of wheat *Triticum aestivum* L. plants and powdery mildew pathogen *Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici* (syn. *Erysiphe graminis*). We studied the change in the number of pathogen colonies on susceptible wheat leaves (Zarya and Tavrishanka varieties) when two-week-old seedlings were treated with various ABA concentrations (0–9  $\mu$ M) before and immediately after they were infected. When whole plants were used in the experiment, ABA was added to Knop's solution; in experiments with detached leaves floating in Petri dishes, aqueous solutions of the phytohormone were used. Our results show that the magnitude and direction of the effect of exogenous ABA on the number of colonies of the pathogen depends on its concentration and the time of application relative to the moment of infection. ABA concentration dependence was variable in form: similar concentrations could be inhibitory, resulting in the minimum number of colonies, or stimulating, with the maximum number of colonies. At the same time, the pre-infection use of ABA was more likely to be inhibitory. The non-monotonicity and variation of the form of concentration dependence could probably account for the contradictory literature data on the immunomodulatory properties of ABA. The complex nature of the concentration dependence and the corresponding variation in the immunological state within a fairly wide range seem to ensure the

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: phimmunitet@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-7400-4050

maintenance of equilibrium in the pathosystem and the chances for survival of both the host plant and the pathogen.

**Keywords:** *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, powdery mildew, wheat, susceptibility, abscisic acid (ABA), concentration dependence.

---

Citation: Babosha A.V. Effect of abscisic acid on the susceptibility of wheat leaves to powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(2), 164-172. DOI: 10.17516/1997-1389-0316

---

## **Влияние абсцизовой кислоты на восприимчивость листьев пшеницы к возбудителю мучнистой росы *Blumeria graminis* f. sp. *tritici***

**А.В. Бабоша**

*Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН  
Российская Федерация, Москва*

---

**Аннотация.** Абсцизовой кислоте (АБК) принадлежит важная роль в регуляции защитных процессов при стрессах различной природы. В отличие от абиотических стрессов при взаимодействии растения и патогена этот фитогормон в большинстве случаев является негативным регулятором устойчивости. Однако даже при сходном характере патогенеза активность АБК может быть разнонаправленной. В частности, обработка АБК в разных экспериментах индуцировала как снижение, так и увеличение восприимчивости злаков к мучнистой росе. Целью данной работы явилось изучение иммуномодулирующих свойств экзогенной АБК в зависимости от ее концентрации в патосистеме, включающей растения пшеницы *Triticum aestivum* L. и возбудитель мучнистой росы *Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici* (syn. *Erysiphe graminis*). Исследовали изменение числа колоний патогена на листьях восприимчивой пшеницы (сортов Заря и Тавричанка) при обработке 2-недельных проростков различными концентрациями АБК (0–9 мкМ) до и непосредственно после инфицирования. При обработке целых растений АБК добавляли в раствор Кнопа, в экспериментах с отделенными листьями на плаву в чашках Петри использовали водные растворы фитогормона. Показано, что величина и направленность воздействия экзогенной АБК на число колоний патогена зависят от ее концентрации и времени применения относительно момента инфицирования. Концентрационная зависимость для АБК варьировала по форме, могла иметь минимум (уменьшение восприимчивости) или максимум (увеличение восприимчивости) числа колоний при сходных концентрациях. При этом ингибирование роста патогена было более характерно при предварительной обработке АБК. Немонотонность и варьирование формы зависимости от концентрации, вероятно, могут объяснить имеющуюся в литературе

неоднозначность при определении иммуномодулирующих свойств АБК. Сложный характер концентрационной зависимости и обусловленное им варьирование в достаточно широких пределах иммунологического состояния, по-видимому, обеспечивают поддержание равновесия в патосистеме и шансы на выживание как растению-хозяину, так и патогенному организму.

**Ключевые слова:** *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, мучнистая роса, пшеница, восприимчивость, абсцизовая кислота (АБК), концентрационная зависимость.

Цитирование: Бабоша, А.В. Влияние абсцизовой кислоты на восприимчивость листьев пшеницы к возбудителю мучнистой росы *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* / А.В. Бабоша // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 164-172. DOI: 10.17516/1997-1389-0316

## Введение

Абсцизовой кислоте (АБК) принадлежит важная роль в регуляции защитных процессов при стрессах различной природы. Повышение концентрации АБК в растении происходит под действием засухи, засоления, теплового и холодового стрессора (Кулаева, 1994). В отличие от абиотических стрессов при взаимодействии растения и патогена АБК приписывают в большинстве случаев роль негативного регулятора устойчивости (Mauch-Mani, Mauch, 2005). Это обуславливает особый характер изменения устойчивости при комплексном стрессе с участием биотических и абиотических факторов или в условиях, когда один тип стресса предшествует другому (Gupta et al., 2017). Взаимодействия между ответами на биотические и абиотические стрессоры могут быть синергическими или антагонистическими, в регуляции обоих принимает участие АБК (Asselbergh et al., 2008).

В патосистемах с разным типом патогена или на разных стадиях развития активность АБК может быть разнонаправленной (Ton et al., 2009; Van Gijsegem et al., 2017). Однако даже в патосистемах с участием биотрофных патогенов получены противоречивые результаты. Так, АБК ингибировала развитие бурой и желтой ржавчины (Левин, 1984; Эйдельмант и др., 1985; Ларина и др., 1991),

однако стимулировала развитие стеблевой ржавчины (Жигалкина, Чигрин, 1986). Обработка АБК в разных экспериментах могла стимулировать развитие мучнистой росы ячменя (Edwards, 1983) или индуцировать определенный уровень устойчивости (Wiese et al., 2004).

Негативная роль АБК по отношению к устойчивости растений, по-видимому, обусловлена ее активностью как антагониста салициловой кислоты, что приводит к ингибированию защитных реакций и приобретенной устойчивости (Anderson et al., 2004; Yasuda et al., 2008; Sugano et al., 2013). Позитивное воздействие АБК на устойчивость к патогенам может быть связано с регуляцией функции устьиц (Lim et al., 2015; Melotto et al., 2017) или образованием папилл (Asselbergh et al., 2008; Garcia-Andrade et al., 2011).

Значительное число патогенных и микоризных грибов синтезируют АБК (Талиева, Филимонова, 1992; Stocoll et al., 1991; Danneberg et al., 1993; Siewers et al., 2004). Можно предположить, что обработка этим гормоном на разных этапах инфекционного процесса может в определенной степени моделировать повышение уровня АБК в стрессовых условиях.

Целью настоящей работы явилось изучение иммуномодулирующих свойств экзоген-

ной АБК в зависимости от ее концентрации в патосистеме, включающей растения пшеницы *Triticum aestivum* L. и возбудитель мучнистой росы *Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici*.

### Материалы и методы

В работе использовали 2-недельные растения пшеницы *T. aestivum* сортов Заря и Тавричанка, которые выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на растворе Кнопа при температуре 20–22 °С и 16-часовом фотопериоде при освещении люминесцентными лампами (2000–3000 лкс). Инокуляцию возбудителем мучнистой росы пшеницы *B. graminis* f. sp. *tritici* (syn. *Erysiphe graminis*) проводили путем стряхивания конидиального инокулюма с инфицированных листьев нескольких растений-накопителей с применением методики, обеспечивающей максимально равномерное инфицирование (Babosha, 2009). В работе использовали популяцию патогена, собранную в Московской области и поддерживаемую в лабораторных условиях на растениях пшеницы восприимчивых сортов. Растения пшеницы сорта Заря помещали на раствор Кнопа с добавлением 0,25, 0,5, 1, 1,5, 3, 4,5 и 9 мкМ абсцизовой кислоты (АБК, Sigma, США) непосредственно после инфицирования. С растениями пшеницы сорта Тавричанка проводили три типа экспериментов в зависимости от схемы обработки АБК, которую добавляли в раствор Кнопа в концентрациях 0,062, 0,125, 0,25, 0,5 и 1 мкМ: 1) за 2 сут до инфицирования с последующей заменой на раствор Кнопа без АБК после инокуляции патогена; 2) непосредственно после инфицирования (в этих растворах растения оставляли до момента подсчета колоний); 3) за 7 сут до инфицирования с заменой на свежеприготовленные растворы АБК в тех же концентрациях после инокуляции патогена.

В контрольных вариантах использовали раствор Кнопа без АБК. В опыте с обработкой листьев на плаву отделенные листья помещали в чашки Петри на водные растворы АБК (0,25, 0,5, 1, 1,5, 3, 4,5 и 9 мкМ) непосредственно после инокуляции патогена (сорт Заря). После появления видимых колоний мучнистой росы (5–7 сут) с применением бинокулярной лупы учитывали их число на абаксиальной и адаксиальной поверхностях 8–12 листьев на участке длиной 7,5 см. В опыте использовали 1-е и 2-е настоящие листья примерно одинаковой ширины (3,5–4 мм). Достоверными считали различия между средними контроля и опыта с использованием *t*-критерия и  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены на рис. 1 и 2. Концентрационные зависимости на рис. 1 были получены при обработке АБК растений пшеницы сорта Заря непосредственно после их инфицирования. В этих экспериментах данный гормон оказывал преимущественно ингибирующее действие на число колоний возбудителя мучнистой росы. Характерной особенностью концентрационных кривых рис. 1 является наличие минимума при низких концентрациях (0,5 на кривой 2 и 1 мкМ на кривой 1). В обоих случаях увеличение концентрации АБК ослабляло ингибирование. На листьях интактных растений при высоких концентрациях кривая имела плато: при увеличении дозы АБК выше 1 мкМ число колоний не изменялось, хотя и оставалось достоверно ниже контроля. На отделенных листьях при увеличении дозы ингибирование полностью исчезало, а сам минимум приходился на область более высоких концентраций. Сходные кривые получены на листьях пшеницы сорта Тавричанка (рис. 2), но в варианте с обработкой за двое суток до

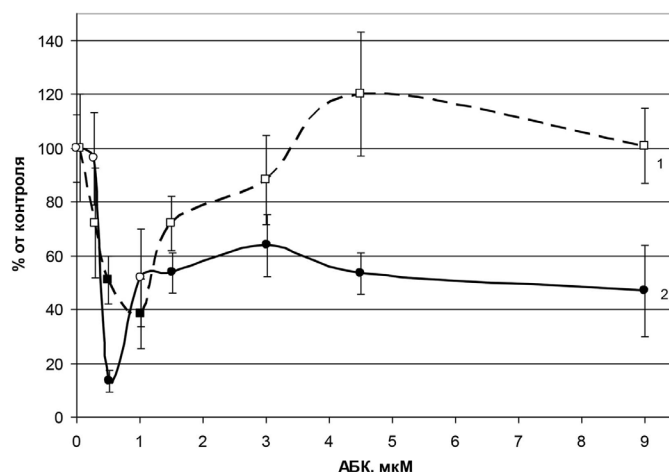


Рис. 1. Влияние АБК на число колоний мучнистой росы (% от контроля, 1-е настоящие листья) при обработке отделенных листьев (1) и растений (2) пшеницы сорта Заря непосредственно после инфицирования. В контроле на отделенных и интактных листьях наблюдали  $2,8 \pm 0,6$  и  $23 \pm 3$  колонии/см<sup>2</sup> соответственно. Заполненным маркером отмечены варианты, достоверно отличающиеся от контроля

Fig. 1. Effect of ABA treatment on the number of powdery mildew colonies (% of control, first leaves) on detached leaves (1) and plants (2) of Zarya wheat immediately after infection. In the control, on detached and intact leaves,  $2.8 \pm 0.6$  and  $23 \pm 3$  colonies/cm<sup>2</sup>, respectively, were observed. The filled marker indicates treatments that differ significantly from the control

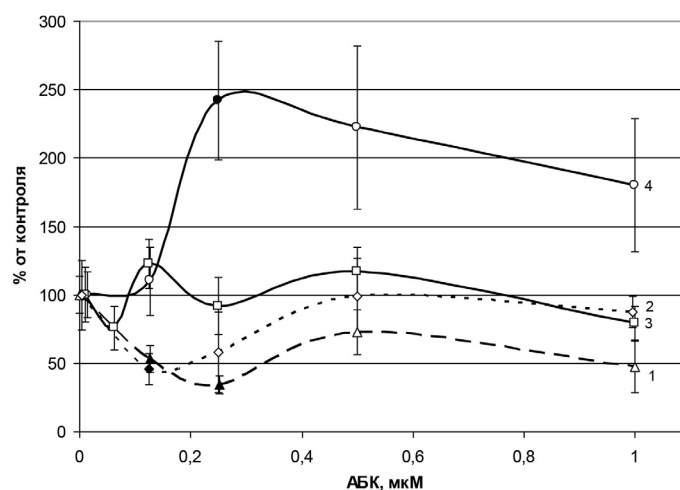


Рис. 2. Влияние времени обработки АБК на число колоний мучнистой росы (% от контроля). Растения пшеницы сорта Тавричанка обработаны: 1 – за 2 сут до инфицирования (1-й лист); 2 – за 2 сут до инфицирования (2-й лист); 3 – непосредственно после инфицирования (1-й лист); 4 – за 7 сут до инфицирования и дополнительно после инфицирования (1-й лист). В контроле  $14,9 \pm 2,0$  (1),  $6,8 \pm 1,7$  (2),  $18,8 \pm 3,8$  (3) и  $4,2 \pm 0,7$  (4) колонии/см<sup>2</sup>. Заполненным маркером отмечены варианты, достоверно отличающиеся от контроля

Fig. 2. Effect of ABA treatment before and after infection on the number of powdery mildew colonies (% of control). Treatment of Tavranchanka wheat plants: 1 – 2 days before infection (first leaf); 2 – 2 days before infection (second leaf); 3 – immediately after infection (first leaf); 4 – 7 days before infection and additionally after infection (first leaf). In the control,  $14.9 \pm 2.0$  (1),  $6.8 \pm 1.7$  (2),  $18.8 \pm 3.8$  (3) and  $4.2 \pm 0.7$  (4) colonies/cm<sup>2</sup>. The filled marker indicates treatments that differ significantly from the control

инфицирования. Наибольшее ингибирующее действие на данном сорте имели концентрации АБК 0,125 и 0,25 мкМ. При этом подсчет колоний на вторых листьях показал их несколько меньшую отзывчивость на ингибирующее действие АБК. При более позднем применении АБК в данном эксперименте ингибирование исчезало (при обработке непосредственно после инфицирования, кривая 3), а при длительной инкубации растений в растворах АБК как до инфицирования, так и после него происходила смена знака иммуномодуляции. На кривой 4 при концентрации 0,25 мкМ видны достоверные отличия среднего числа колоний от контроля, однако изменения имеют противоположный знак: АБК стимулирует развитие мучнистой росы.

Таким образом, зависимость иммуномодулирующей активности АБК от концентрации не монотонная. Наиболее характерным элементом концентрационной кривой был минимум при низких концентрациях, который проявился у растений обоих сортов. Форма кривой в разных модельных системах отделенных листьев и интактных растений (сорт Заря) имела отличия в положении пика ингибирования при низких концентрациях и в знаке иммуномодуляции при более высоких (рис. 1). Интересной особенностью формы концентрационных кривых, полученных на сорте Тавричанка, был переход от ингибирования числа колоний при применении АБК до инокуляции возбудителя мучнистой росы к его стимуляции при дополнительной обработке после инфицирования (рис. 2). При этом на концентрационной кривой в варианте обработки АБК непосредственно после инокуляции наблюдали статистически несущественные флуктуации ординаты вокруг уровня восприимчивости в контроле. В определенном смысле эта последняя кривая имела промежуточный характер между двумя

упомянутыми выше. Следует отметить, что ранее кривые сходной формы наблюдали в той же патосистеме при изучении иммуномодулирующих свойств цитокининов (Babosha, 2009). В случае зеатина постепенную трансформацию концентрационной кривой с экстремумом одного знака в кривую с экстремумом другого знака, а также промежуточную зависимость со значениями, близкими к контролю, наблюдали при изменении минерального состава среды инкубации и при совместной инкубации растений в растворах зеатина с добавлением разных концентраций тидиазурина. Похожие трансформации формы кривой были получены при имитации сложной концентрационной зависимости с помощью математической модели, основанной на последовательном соединении двух процессов с субстратным ингибированием (Babosha, 2009). Это позволяет предположить принадлежность концентрационных зависимостей АБК к тому же классу многофазных кривых, что не является неожиданным, если принять во внимание общеизвестную взаимозависимость сигнальных систем разных фитогормонов (Shigenaga, Argueso, 2016).

При математическом моделировании варьирование формы концентрационной зависимости происходило при изменении параметров, соответствующих синтезу, разрушению или транспорту гормонального вещества. Очевидно, что в реальных условиях изменение активности соответствующих ферментных систем может происходить под действием разных факторов, включая и те, интенсивность которых не контролировалась или принципиально трудно контролируется в эксперименте. Вероятно, именно этим можно объяснить имеющуюся в литературе неоднозначность при определении иммуномодулирующих свойств АБК, а также ряда других физиологически активных веществ.

Более раннее применение АБК относительно момента инфицирования с большей вероятностью имело ингибирующий характер (рис. 2). Кроме того, в трех независимых дополнительных экспериментах на листьях сорта Заря, проведенных по сходной схеме, при обработке АБК до инфицирования и непосредственно после инфицирования в 20 вариантах с использованием разных концентраций получено ингибирование и только в пяти вариантах – стимуляция числа колоний по сравнению с контролем. Наоборот, при использовании АБК через 1 сут и более после инфицирования соотношение ингибирования и стимуляции числа колоний было примерно одинаковым: в 15 вариантах наблюдали тенденцию к ингибированию, а в 20 – к стимуляции (данные не представлены).

В данной работе транзитное повышение уровня АБК, которое сопровождает реакцию растения на действие стрессоров различной природы, моделировали обработкой АБК корней растений. Важно то, в какой мере результаты, полученные в использованной модельной системе, отражают закономерности участия АБК в регуляции процессов патогенеза. Поскольку основным местом синтеза АБК являются корни (Hartung et al., 2002), обработка корней данным фитогормоном представляется достаточно адекватной модельной системой для исследования его иммуномодулирующих свойств (Wiese et al., 2004). При действии теплового шока макси-

мум содержания АБК в корнях пшеницы был достигнут через 24 ч (Ефремов и др., 1992). Сходная динамика имела место и в листьях пшеницы, но с опозданием на 1 сут. В наших экспериментах длительность инкубации в растворах экзогенного гормона примерно соответствовала длительности транзитных пиков концентрации АБК при этих стрессах. При обработке наблюдали разнонаправленные изменения восприимчивости листьев растений к возбудителю мучнистой росы. Направление активности АБК в отношении одного и того же биотрофного патогена зависело не только от времени применения, но и от ее концентрации. В природной среде различные абиотические стрессы индуцируют транзитные пики концентрации АБК разной напряженности и разной динамики. Это создает достаточно высокое разнообразие как содержания АБК, так и, возможно, активности биохимических процессов, влияющих на форму зависимости иммуномодулирующей активности АБК от ее концентрации. При сопряжении этих изменений с эпифитотией результат инфицирования потенциально также может быть достаточно разнообразным. Варьирование иммунологического состояния в широких пределах, которое достигается за счет сложной концентрационной зависимости данного фитогормона, вероятно, обеспечивает поддержание равновесия и шансы на выживание как растению-хозяину, так и патогенному организму.

#### Благодарности / Acknowledgements

Работа выполнена в рамках госзадания ГБС РАН (№ 118021490111-5).

The study was carried out in accordance with Institutional research project No. 118021490111-5.

#### Список литературы / References

- Ефремов Д.П., Каравайко Н.Н., Кулаева О.Н. (1992) Влияние теплового шока и картолина-2 на рост проростков ячменя и содержание в них фитогормонов. *Доклады РАН*, 323(2): 362–365  
[Efremov D.P., Karavaiko N.N., Kulaeva O.N. (1992) The effect of heat shock and cartolin-2 on the

growth of barley seedlings and the content of phytohormones in them. *Reports of the Russian Academy of Sciences [Doklady RAN]*, 323(2): 362-365 (in Russian)]

Жигалкина Т.Е., Чигрин В.В. (1986) Изменения метаболизма, связанные с повышением интенсивности заражения восприимчивых растений пшеницы возбудителем стеблевой ржавчины: возможная роль этилена и абсцизовой кислоты. *Микология и фитопатология*, 20(3): 194–199 [Zhigalkina T.E., Chigrin V.V. (1986) Changes in metabolism associated with increased intensity of contamination of susceptible wheat plants with causative agent of stem rust: possible role of ethylene and abscisic acid. *Mycology and Phytopathology [Mikologiya i fitopatologiya]*, 20(3): 194-199 (in Russian)]

Кулаева О.Н. (1994) Физиологическая роль абсцизовой кислоты. *Физиология растений*, 41: 645–646 [Kulaeva O.N. (1994) The physiological role of abscisic acid. *Plant Physiology [Fiziologiya rasteniy]*, 41: 645–646 (in Russian)]

Ларина С.Ю., Музыкантов В.П., Рункова Л.В. (1991) Влияние физиологически активных веществ на развитие бурой ржавчины на некоторых сортах и изогенных линиях пшеницы. *Облигатный паразитизм: цитофизиологические аспекты*. М., Наука, с. 47–51 [Larina S.Yu., Muzykantov V.P., Runkova L.V. (1991) Influence of physiologically active substances on the development of brown rust on some varieties and isogenic lines of wheat. *Obligatory parasitism: cytophysiological aspects*. Moscow, Nauka, p. 47-51 (in Russian)]

Левин И.М. (1984) Влияние фитогормонов на развитие бурой ржавчины у изолированных листьев пшеницы. *Физиология растений*, 31(2): 356–361 [Levin I.M. (1984) The influence of phytohormones on the development of brown rust in isolated leaves of wheat. *Plant Physiology [Fiziologiya rasteniy]*, 31(2): 356-361 (in Russian)]

Талиева М.Н., Филимонова М.В. (1992) О паразитической специализации видов рода *Botrytis* в свете новых экспериментальных данных. *Журнал общей биологии*, 53(2): 225–231 [Talieva M.N., Filimonova M.V. (1992) On the parasitic specialization of species of the genus *Botrytis* in the light of new experimental data. *Journal of General Biology [Zhurnal obshchey biologii]*, 53(2): 225-231 (in Russian)]

Эйдельмант Н.М., Демурина А.К., Есипова И.В., Крюкова Л.И. (1985) О корреляции между соотношением различных компонентов изопреноидной рострегулирующей системы и устойчивостью растений пшеницы к желтой ржавчине. *Узбекский биологический журнал*, 4: 23–26 [Eidelnant N.M., Demurina A.K., Yesipova I.V., Kryukova L.I. (1985) On the correlation between the ratio of various components of the isoprenoid growth regulating system and the resistance of wheat plants to yellow rust. *Uzbek Biological Journal [Uzbekskiy biologicheskiy zhurnal]*, 4: 23-26 (in Russian)]

Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R., Kazan K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in arabidopsis. *Plant Cell*, 16(12): 3460–3479

Asselbergh B., De Vleeschauwer D., Hofte M. (2008) Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6): 709–719

Babosha A.V. (2009) Regulation of resistance and susceptibility in wheat powdery mildew pathosystem with exogenous cytokinins. *Journal of Plant Physiology*, 166(17): 1892–1903



- Crocoll C., Kettner J., Dörffling K. (1991) Abscisic acid in saprophytic and parasitic species of fungi. *Phytochemistry*, 30(4): 1059–1060
- Danneberg G., Latus C., Zimmer W., Hundeshagen B., Schneiderpoetsch H., Bothe H. (1993) Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Physiology*, 141(1): 33–39
- Edwards H.H. (1983) Effect of kinetin, abscisic acid, and cation on host-parasite relations of barley inoculated with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 107(1): 22–30
- Garcia-Andrade J., Ramirez V., Flors V., Vera P. (2011) Arabidopsis *ocp3* mutant reveals a mechanism linking ABA and JA to pathogen-induced callose deposition. *Plant Journal*, 67(5): 783–794
- Gupta A., Hisano H., Hojo Y., Matsuura T., Ikeda Y., Mori I.C., Senthil-Kumar M. (2017) Global profiling of phytohormone dynamics during combined drought and pathogen stress in *Arabidopsis thaliana* reveals ABA and JA as major regulators. *Scientific Reports*, 7: 4017
- Hartung W., Sauter A., Hose E. (2002) Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 27–32
- Lim C.W., Baek W., Jung J., Kim J.H., Lee S.C. (2015) Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7): 15251–15270
- Mauch-Mani B., Mauch F. (2005) The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4): 409–414
- Melotto M., Zhang L., Oblessuc P.R., He S.Y. (2017) Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology*, 174(2): 561–571
- Shigenaga A.M., Argueso C.T. (2016) No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 56: 174–189
- Siewers V., Smedsgaard J., Tudzynski P. (2004) The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7): 3868–3876
- Sugano S., Sugimoto T., Takatsuji H., Jiang C.-J. (2013) Induction of resistance to *Phytophthora sojae* in soyabean (*Glycine max*) by salicylic acid and ethylene. *Plant Pathology*, 62(5): 1048–1056
- Ton J., Flors V., Mauch-Mani B. (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(6): 310–317
- Van Gijsegem F., Pédrón J., Patrit O., Simond-Côte E., Maia-Grondard A., Petriacq P., Gonzalez R., Blottière L., Kraepiel Y. (2017) Manipulation of ABA content in *Arabidopsis thaliana* modifies sensitivity and oxidative stress response to *Dickeya dadantii* and influences peroxidase activity. *Frontiers in Plant Science*, 8: 456
- Wiese J., Kranz T., Schubert S. (2004) Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. *Plant Biology*, 6(5): 529–536
- Yasuda M., Ishikawa A., Jikumaru Y., Seki M., Umezawa T., Asami T., Maruyama-Nakashita A., Kudo T., Shinozaki K., Yoshida S., Nakashita H. (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid–mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20(6): 1678–1692

DOI 10.17516/1997-1389-0285

УДК 633.16:581.19

## **Effect of Phosphate Deficit on Root Growth, Production of Reactive Oxygen Species and Hormone Content in Barley Plants**

**Guzel R. Kudoyarova, Lidiya B. Vysotskaya\*,  
Arina V. Feoktistova, Igor I. Ivanov,**

**Denis U. Zaitzev and Guzel R. Akhiyarova**

*Ufa Institute of Biology Ufa Federal Research Center RAS  
Ufa, Russian Federation*

Received 20.02.2018, received in revised form 25.07.2018, accepted 05.08.2018, published online 25.12.2018

**Abstract.** The article presents the results of research into the effect of removing phosphate from a nutrient medium on the content of auxins and cytokinins in roots, root elongation and content of reactive oxygen species in root tips of the barley ‘Steptoe’. In our experiments, the growth response was detected as root elongation after a 4-day exposure to a phosphate-free medium. Activation of linear root growth was preceded by changes in hormonal balance and in the level of reactive oxygen species. Auxin content in the roots increased after 6 h of phosphate starvation and a two-fold increase in the concentration of auxins in roots was detected by the end of the first day of the exposure to the phosphate deficit conditions. Staining with diaminobenzidine revealed an increased level of reactive oxygen species in the root tips of phosphate-starved plants after 6 h of exposure. However, after one day (24 h), a reverse pattern was observed: the level of staining was higher in the plants supplied with phosphates. Immunolocalisation of cytokinins in the root tips, where the zones of cell division and extension determining root elongation are located, showed a decreased content of zeatin in the cells under the effect of phosphorus deficit. The obtained data suggest that the detected rise in the amount of reactive oxygen species was due to the increased concentration of auxins accumulated as a result of the phosphate deficit effect on the barley plants. The increase in ROS and auxins contents could in turn influence the level of cytokinins and, in the end, affect root elongation. Further experiments are needed to test this hypothesis.

**Keywords:** *Hordeum vulgare*, phosphate deficit, root growth, auxins, cytokinins, reactive oxygen species.

---

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: vysotskaya@anrb.ru

Citation: Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Feoktistova A.V., Ivanov I.I., Zaitzev D.U., Akhiyarova G.R. Effect of phosphate deficit on root growth, production of reactive oxygen species and hormone content in barley plants. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(2), 173-178. DOI: 10.17516/1997-1389-0285

## **Влияние дефицита фосфора на рост корней, продукцию активных форм кислорода и содержание гормонов в растениях ячменя**

**Г.Р. Кудоярова, Л.Б. Высоцкая, А.В. Феоктистова,  
И.И. Иванов, Д.Ю. Зайцев, Г.Р. Ахиярова**  
*Уфимский институт биологии  
Уфимского федерального исследовательского центра РАН  
Российская Федерация, Уфа*

**Аннотация.** В работе представлены результаты изучения влияния удаления фосфатов из питательного раствора на содержание ауксинов и цитокининов в корнях, удлинение корней и содержание активных форм кислорода в кончиках корней растений ячменя. Ростовая реакция, проявившаяся в наших экспериментах в удлинении корней растений ячменя сорта Steptoe, была отмечена после 4 суток воздействия бесфосфатной среды. Активации линейной скорости роста корней предшествовали изменения гормонального баланса и уровня реактивных форм кислорода. С помощью метода иммуноферментного анализа через 6 часов воздействия дефицита фосфора было отмечено достоверное возрастание, а к концу первых суток – двукратное увеличение концентрации ауксинов в корне. На фоне фосфатного голодания окрашивание корней диаминобензидином позволило выявить повышенный уровень реактивных форм кислорода в кончиках корней через 6 часов; по истечении первых суток (24 ч) наблюдали обратную картину – уровень окрашивания корней снабженных фосфатами растений был выше. Результаты иммунолокализации цитокининов в кончиках корней, где и находятся определяющие рост корней в длину зоны деления и растяжения, показали снижение содержания зеатина в клетках, находящихся под влиянием дефицита фосфора. Полученные данные позволяют предположить, что выявленное накопление в корнях активных форм кислорода может быть обусловлено повышенной концентрацией ауксинов, накопившихся в результате воздействия дефицита фосфора на растения ячменя. Повышение уровня ауксинов и реактивных форм кислорода в свою очередь могло повлиять на уровень цитокининов и, в конечном счете, на удлинение корней. Требуются дальнейшие исследования для проверки этого предположения.

**Ключевые слова:** *Hordeum vulgare*, дефицит фосфора, рост корней, ауксины, цитокинины, активные формы кислорода.

Цитирование: Кудоярова, Г.Р. Влияние дефицита фосфора на рост корней, продукцию активных форм кислорода и содержание гормонов в растениях ячменя / Г.Р. Кудоярова, Л.Б. Высоцкая, А.В. Феоктистова, И.И. Иванов, Д.Ю. Зайцев, Г.Р. Ахиярова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 173-178. DOI: 10.17516/1997-1389-0285

## Introduction

Regulation of the rate of root growth and development is an important mechanism of plant adaptation to phosphate starvation. Allocation of new biomass to root growth (Hermans et al., 2006; Wang et al., 2015), changes in the rates of primary roots elongation and the pattern of root branching influence root ability to explore different layers of soil and the nutrient uptake capacity of plants (Lynch, 2011). Nevertheless, the mechanisms of root growth response to phosphate starvation are still not completely clear (Aibara and Miwa, 2014). A deficit in phosphates influences hormone concentration in plants (Ribot et al., 2008; Rubio et al., 2009) and reactive oxygen species (ROS) production, while both hormones and ROS are capable of affecting root growth and development (Tyburski et al., 2010). However, little attention has been given to possible interaction of these factors under phosphate starvation conditions. In the present paper we study the effect of removing phosphate from the nutrient medium on auxins and cytokinins contents in roots, root elongation and ROS content in the root tips of barley plants (up to the zone of root hairs).

## Materials and methods

Barley plants (*Hordeum vulgare* L. 'Stephoe') were grown on 0.1 strength Hoagland-Arnon (H-A) nutrient medium (0.5 mM KNO<sub>3</sub>, 0.5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaSO<sub>4</sub>) in which potassium phosphate was substituted with sodium phosphate (modified H-A). After stratification and germination, half of the seedlings were transferred to a medium without phosphates (P-). Plants were grown at the 14-h photoperiod with the irradiance of 400 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR, temperature of 25/18°C

(day/night) and relative air humidity (RH) of 60–70%. Preliminary experiments had showed that substitution of potassium for sodium phosphate did not inhibit the growth of plants.

Auxin content was determined by means of enzyme immunoassay (Vysotskaya et al., 2003) and ROS level in roots was detected using diaminobenzidine (DAB) staining (the protocol was adapted from Daudi et al., 2012) after 6 and 24 hours of phosphate starvation. For immunolocalisation of cytokinins, root tips were fixed in a mixture of aldehydes and carbodiimide (Kudoyarova et al., 2014) on the second day after removing phosphates from the nutrient solution. The intensity of staining on the photographs was estimated in arbitrary units using the ImageJ program (the minimum and maximum values were taken for 0% and 100%, respectively). Root length was measured on the fourth day of the experiment.

## Results and discussion

Auxin content in the roots increased after 6 h of phosphate (P) starvation (97 ± 11 and 160 ± 17 ng/g of root fresh weight on the medium with and without P, respectively; mean±SE, n=9) and after 24 h it was 2 times higher than in the control (72±6 and 120±9 ng/g of root fresh weight on the medium with and without P, respectively; mean±SE, n=9). These results agree with the literature data (Nacry et al., 2005). DAB staining revealed an increased ROS level in the root tips of the plants grown without phosphates during 6 h: the intensity of staining increased approximately 3-fold (Fig. 1). After 24 h of exposure, a reverse pattern was observed and the level of staining was 3.5 times higher in plants supplied with phosphates (Fig. 2).

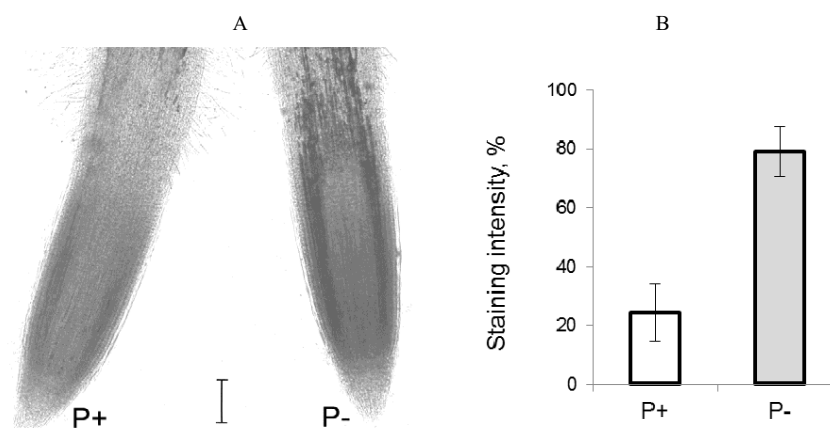


Fig. 1. (A) Level of ROS in root tips of barley plants (intensity of DAB staining) grown on modified Hoagland-Arnon medium (P+) and 6 h after removing phosphates (P-) from the nutrient medium. Scale bar: 200  $\mu$ m. (B) Diagram presents the results of the semiquantitative assay of intensity of staining of root tips of 'Steptoe' obtained using the ImageJ program (as described by Sharipova et al., 2016). The images of nine independent sections per treatment were taken. The intensity of staining was expressed in arbitrary units, with maximum and minimum staining intensity taken for 100% and 0%, respectively. Error bars are standard error, n=9

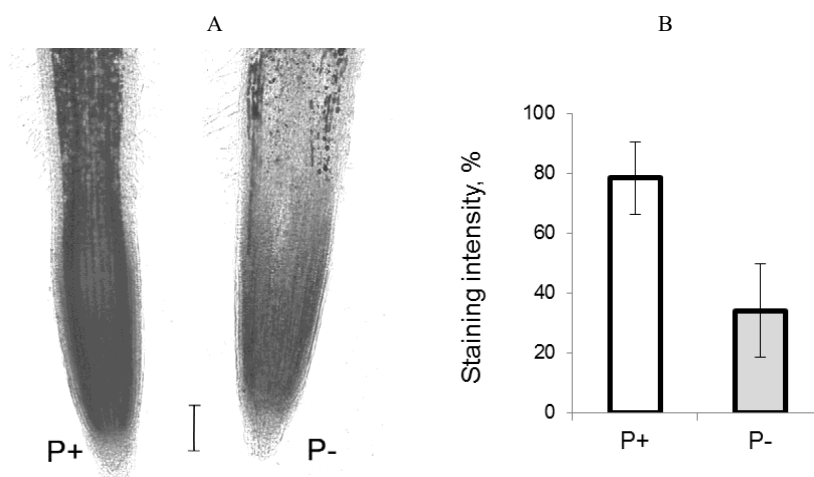


Fig. 2. (A) Level of ROS in root tips of barley plants (intensity of DAB staining) grown on modified Hoagland-Arnon medium (P+) and 1 d after removing phosphates (P-) from the nutrient medium. Scale bar: 200  $\mu$ m. (B) Diagram presents the results of the semiquantitative assay of intensity of staining of root tips of 'Steptoe' obtained using the ImageJ program (as described by Sharipova et al., 2016). The images of nine independent sections per treatment were taken. The intensity of staining was expressed in arbitrary units, with maximum and minimum staining intensity taken for 100% and 0%, respectively. Error bars are standard error, n=9

Auxins are known, on the one hand, to induce ROS production and, on the other hand, to contribute to their inactivation brought about by up-regulation of the genes coding for antioxidant enzymes (Krishnamurthy and Rathinasabapathi, 2013). Auxin-induced

ROS production may link the elevated auxin concentration with the initial increase in the ROS level in the roots of P-starved plants, while the hormone-induced inactivation of ROS may explain the subsequent decline in ROS detected under P deficit.

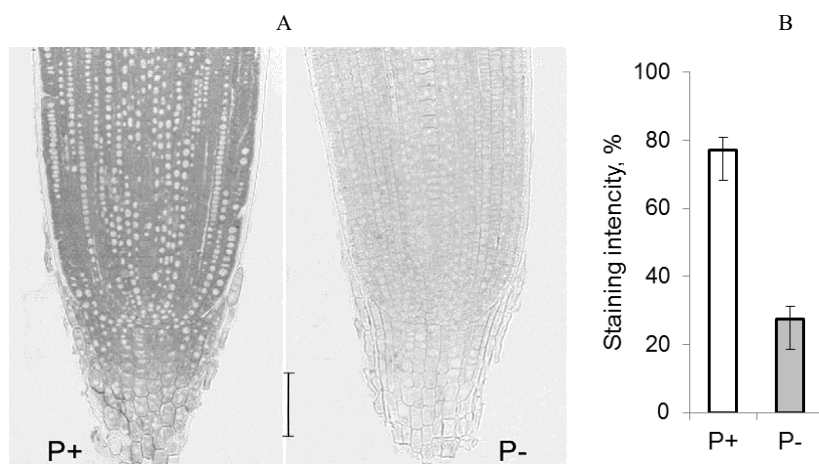


Fig. 3. (A) Immunohistochemical localisation of cytokinin zeatin in root tips of barley seedlings grown on modified Hoagland-Arnon medium (P+) and placed for 2 days on the medium without phosphates (P-). Scale bar: 50  $\mu$ m. (B) Diagram presents the results of the semiquantitative assay of intensity of staining of root tips obtained using the ImageJ program (as described by Sharipova et al., 2016). The images of nine independent sections per treatment were taken. The intensity of staining was expressed in arbitrary units, with maximum and minimum staining intensity taken for 100% and 0%, respectively. Error bars are standard error, n=9

In the present experiments, phosphate deficit stimulated a 16% elongation in roots on the medium without P after 4 days of exposure ( $29.5 \pm 1.1$  and  $34.3 \pm 1.3$  cm on the medium with and without P, respectively; mean  $\pm$  SE, n=40).

ROS are known to influence cell extension (Tyburski et al., 2010) suggesting their possible involvement in the changes in root elongation induced by P deficit. However, the data are contradictory as both stimulatory and inhibitory effects of ROS have been reported (Tsukagoshi et al., 2010).

Immunolocalisation of cytokinins in root tips showed a decline in zeatin content in the cells influenced by P deficit (Fig. 3). Since cytokinins are known to inhibit root growth at the expense of cell division (Ivanov and Filin,

2018), acceleration of root growth under P deficit is likely to be due to a decrease in the level of cytokinins in cells. The decline in the level of cytokinins could result from either a transitory increase in the ROS level exerting cytokinins decay through their oxidation or accumulation of auxins able to activate enzymatic destruction of cytokinins (Hare and van Staden, 1994).

### Conclusion

The obtained results suggest the following succession of events: a phosphate deficit causes changes in the ROS level brought about by accumulation of auxins which finally results in the changes in cytokinins level and elongation of roots. Further research is needed to test this hypothesis.

### Acknowledgements / Благодарности

The equipment for the present research was provided by the Centre of shared research facilities "Bioanalit".

В работе было использовано оборудование ЦКП «БиоАналит» УИБ УФИЦ РАН.

**References / Список литературы**

- Aibara I., Miwa K. (2014) Strategies for optimization of mineral nutrient transport in plants: multilevel regulation of nutrient dependent dynamics of root architecture and transporter activity. *Plant and Cell Physiology*, 55(12): 2027–2036
- Daudi A., Cheng Z., O'Brien J.A., Mammarella N., Khan S., Ausubel F.M., Bolwell G.P. (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell*, 24(1): 275–287
- Hare P.D., van Staden J. (1994) Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum*, 91(1): 128–136
- Hermans C., Hammond J.P., White P.J., Verbruggen N. (2006) How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, 11(12): 610–617
- Ivanov V.B., Filin A.N. (2018) Cytokinins regulate root growth through its action on meristematic cell proliferation but not on the transition to differentiation. *Functional Plant Biology*, 45(1-2): 215-221
- Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Yu. (2014) Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). *Journal of Experimental Botany*, 65(9): 2287–2294
- Krishnamurthy A., Rathinasabapathi B. (2013) Oxidative stress tolerance in plants. Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 8(10): e25761
- Lynch J.P. (2011) Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiology*, 156(3): 1041–1049
- Nacry P., Canivenc G., Muller B., Azmi A., Onckelen H.V., Rossignol M., Doumas P. (2005) A role for auxin redistribution in the response of the root system architecture to phosphate starvation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(4): 2061–2074
- Ribot C., Wang Y., Poirier Y. (2008) Expression analyses of three members of the AtPHO1 family reveal differential interactions between signaling pathways involved in phosphate deficiency and the responses to auxin, cytokinin, and abscisic acid. *Planta*, 227(5): 1025–1036
- Rubio V., Bustos R., Irigoyen M.L., Cardona-Lopez X., Rojas-Triana M., Paz-Ares J. (2009) Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Molecular Biology*, 69(4): 361–373
- Sharipova G., Veselov D., Kudoyarova G., Fricke W., Dodd I.C., Katsuhara M., Furuichi T., Ivanov I., Veselov S. (2016) Exogenous application of abscisic acid (ABA) increases root and cell hydraulic conductivity and abundance of some aquaporin isoforms in the ABA deficient barley mutant Az34. *Annals of Botany*, 118(4): 777–785
- Tsukagoshi H., Busch W., Benfey P.N. (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 143: 606–616
- Tyburski J., Dunajska K., Tretyn A. (2010) A role for redox factors in shaping root architecture under phosphorus deficiency. *Plant Signaling and Behavior*, 5(1): 64–66
- Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Timergalina L.N., Veselov S.Yu., Dedov A.V., Kudoyarova G.R. (2003) Effect of partial root excision on shoot water relations. *Journal of Plant Physiology*, 160(9): 1011–1015
- Wang Y.-L., Almvik M., Clarke N., Eich-Greatorex S., Ogaard A.F., Krogstad T., Lambers H., Clarke J.L. (2015) Contrasting responses of root morphology and root-exuded organic acids to low phosphorus availability in three important food crops with divergent root traits. *AoB Plants*, 7: plv097

DOI 10.17516/1997-1389-0292

УДК 57.085.23

## ***Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Amaranthus cruentus* L. Epicotils**

**Ragida M. Taipova<sup>a\*</sup>,  
Khalit G. Musin<sup>a,b</sup> and Bulat R. Kuluev<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup>Bashkir State University  
Ufa, Russian Federation*

*<sup>b</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of  
the Ufa Federal Research Centre of the RAS  
Ufa, Russian Federation*

Received 02.03.2018, received in revised form 13.04.2018, accepted 27.04.2018, published online 08.04.2019

**Abstract.** Red amaranth *Amaranthus cruentus* L. is a valuable fodder and grain crop. To generate new varieties of this plant, genetic transformation methods can be used, but for *A. cruentus* such methods remain undeveloped. The present study describes the results of our research in *Agrobacterium*-mediated transformation of epicotyl segments of *A. cruentus* variety “Bagryanyi” by the *ARGOS-LIKE* transgene of *Arabidopsis thaliana* controlled by the 35S promoter in the binary vector pCambia 1301 with a selective hygromycin B resistance gene. For shoot regeneration from epicotyl segments after *Agrobacterium*-mediated transformation, Murashige-Skoog (MS) medium containing 13  $\mu$ M 6-benzylaminopurine and 1  $\mu$ M 1-naphthylacetic acid was used. For the selection of transgenic shoots, 10 mg/L of hygromycin B was added to the MS medium. Rooting of shoots was performed on selective MS medium supplemented with 2  $\mu$ M 3-indoleacetic acid. Three transgenic amaranth plants with the genetic engineering structure 35S::*ARGOS-LIKE* were generated. The efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. cruentus* was 4%. The amaranth plants transgenicity was confirmed by the PCR analysis for the presence of marker and target genes. Two transgenic plants were acclimatized to soil and open air conditions.

**Keywords:** *Amaranthus cruentus*, red amaranth, in vitro, shoots regeneration, *Agrobacterium*-mediated transformation, transgenic plants, *ARGOS-LIKE*.

Citation: Taipova R.M., Musin K.G., Kuluev B.R. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus cruentus* L. epicotils. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(2), 179-187. DOI: 10.17516/1997-1389-0292

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: taipova.ragida@yandex.ru



## Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей амаранта багряного *Amaranthus cruentus* L.

Р.М. Таипова<sup>а</sup>, Х.Г. Мусин<sup>а,б</sup>, Б.Р. Кулуев<sup>а,б</sup>

<sup>а</sup>Башикирский государственный университет  
Российская Федерация, Уфа

<sup>б</sup>Институт биохимии и генетики –  
обособленное структурное подразделение  
Уфимского федерального исследовательского центра РАН  
Российская Федерация, Уфа

**Аннотация.** Амарант багряный *Amaranthus cruentus* L. является ценной кормовой и зерновой культурой. Для получения новых сортов этого растения могут быть использованы методы генетической трансформации, однако для *A. cruentus* такие технологии остаются неразработанными. Данная статья посвящена описанию результатов наших работ по агробактериальной трансформации сегментов эпикотилей *A. cruentus* сорта «Багряный» трансгеном *ARGOS-LIKE Arabidopsis thaliana* L., находящимся под контролем 35S промотора в бинарном векторе pCambia 1301 с селективным геном устойчивости к гигромицину В. Для регенерации побегов из сегментов эпикотилей после агробактериальной трансформации использовали среду Мурасиге-Скуга, содержащую 13 мкМ 6-бензиламинопурина и 1 мкМ 1-нафтилуксусной кислоты. Для селекции трансгенных побегов амаранта в среду добавляли 10 мг/л гигромицина В. Укоренение полученных в ходе работы регенерантов проводили на селективной среде МС с добавлением 2 мкМ 3-индолилуксусной кислоты. В ходе проведенной работы были получены 3 трансгенных растения амаранта багряного, несущие генно-инженерную конструкцию 35S::ARGOS-LIKE. Трансгенность полученных растений амаранта была подтверждена путем ПЦР-анализа на наличие маркерных и целевого генов. Процент эффективности агробактериальной трансформации *A. cruentus* при использованном нами методе составил 4 %. Два трансгенных растения удалось акклиматизировать к условиям почвы и открытого воздуха.

**Ключевые слова:** *Amaranthus cruentus*, амарант багряный, *in vitro*, регенерация побегов, агробактериальная трансформация, трансгенные растения, ARGOS-LIKE.

Цитирование: Таипова, Р.М. Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей амаранта багряного *Amaranthus cruentus* L. / Р.М. Таипова, Х.Г. Мусин, Б.Р. Кулуев // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 179-187. DOI: 10.17516/1997-1389-0292

## Введение

Амарант является растением, применяемым в качестве овощной, кормовой, зерновой, лекарственной и декоративной культур. Высокая питательная ценность, обусловленная повышенным содержанием белка, сбалансированного по аминокислотному составу, количеству витаминов и минеральных солей, делает привлекательным использование амаранта в кулинарии, медицине и сельском хозяйстве (Магомедов, Чиркова, 2015).

Селекционные работы по выведению новых сортов амаранта в России ведутся довольно интенсивно. Получено большое количество отечественных сортов этой культуры с улучшенными ростовыми характеристиками, с повышенной урожайностью и другими хозяйственно ценными признаками (Жужукин, Шор, 2010). Амарант продолжает набирать популярность и может стать одной из важных культур, выращиваемых отечественными сельхозпроизводителями. Одним из препятствий для широкого распространения амаранта является его относительно низкая холодоустойчивость ввиду южного происхождения культуры. Суровые климатические условия нашей страны могут оказывать негативное воздействие, прежде всего, на урожайность амаранта. Для увеличения продуктивности и стрессоустойчивости амаранта могут быть использованы не только методы селекции, но и современные генно-инженерные технологии (Таипова, Кулуев, 2015; Kuluev et al., 2017).

В настоящее время методы трансформации амаранта остаются мало разработанными. В литературе имеются данные лишь о нескольких исследованиях по созданию трансгенных растений амаранта (Jofre-Garfias et al., 1997; Pal et al., 2013; Munusamy et al., 2013; Murugan, Sathishkumar, 2016), однако они не относятся к широко распространенному культурному виду амаранта багряного

*Amaranthus cruentus* L. В свою очередь ранее нами была испытана технология трансформации сорного вида амаранта запрокинутого *Amaranthus retroflexus* L. (щирица) методом погружения цветков (Kuluev et al., 2017). Однако эффективность трансформации амаранта запрокинутого методом погружения цветков оказалась очень низкой (не более 1,4 %). Аналогичные эксперименты были проведены и на примере *A. cruentus*, однако методом floral dip нам не удалось получить ни одного трансгенного растения этого вида амаранта. В связи с этим остается актуальным вопрос разработки новых подходов для получения трансгенных растений этой культуры через использование методов регенерации побегов из эксплантов в условиях *in vitro*.

Продуктивность растений может быть повышена за счет влияния на рост органов. В основе контроля роста органов растений лежат два основных механизма, а именно регуляция клеточного деления и рост клеток растяжением (Gonzalez et al., 2012). Важную роль в координации процессов клеточного деления и растяжения играют белки семейства ARGOS (Feng et al., 2011; Кулуев, Сафиуллина, 2015). У *Arabidopsis thaliana* обнаружено и изучено четыре гена, кодирующие белки данной группы: ARGOS, ARGOS-LIKE (ARL), OSR1 и OSR2 (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006; Feng et al., 2011; Qin et al., 2014). Ген ARGOS-LIKE (ARL) *A. thaliana* кодирует трансмембранный белок, предположительно участвующий в передаче и трансдукции сигналов от фитогормонов к транскрипционным факторам. Сверхэкспрессия генов семейства ARGOS способствует увеличению размеров надземных органов за счет положительного влияния на рост клеток растяжением (Hu et al., 2006), а также приводит к повышению стрессоустойчивости за счет негативного влияния на этиленовый сигналинг (Shi et al., 2015). Ранее нами были по-

лучены трансгенные растения табака, рапса и амаранта запрокинутого, сверхэкспрессирующие ген *ARL* (Kuluev et al., 2013; Михайлова, Кулуев, 2015; Kuluev et al., 2017), некоторые линии которых характеризовались увеличением размеров листьев и стебля по сравнению с контролем. Исходя из полученных ранее данных, генно-инженерная конструкция *35S::ARL* была отобрана для трансформации хозяйственно-ценных растений.

Целью представленной работы была разработка метода агробактериальной трансформации культурного вида амаранта багряного *A. cruentus* с использованием генно-инженерной конструкции *35S::ARL*. Для этого была поставлена задача – получить трансгенные растения амаранта багряного посредством агробактериальной трансформации при культивировании эксплантов эпикотилей на селективных средах, содержащих гигромицин В.

#### Материалы и методы

В работе использовали генно-инженерную конструкцию *35S::ARL*, содержащую целевой ген *ARGOS-LIKE* из *A. thaliana* (Kuluev et al., 2013). Для опытов по агробактериальной трансформации растений амаранта использовали семена *A. cruentus* сорта «Багряный» (Агросервер, Россия), которые перед проращиванием стерилизовали 70 %-ным этиловым спиртом в течение минуты и 20 %-ным раствором отбеливателя «Белизна» (ООО «Башбытпром», Стерлитамак, Россия; представляет собой 15 %-ный раствор гипохлорита натрия) в течение 8 минут, после чего семена тщательно промывали стерильной дистиллированной водой 5-6 раз. После этапа стерилизации семена амаранта рассевали на среду, содержащую половинную концентрацию солей среды Мурасиге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), витамины среды Гамборга (Gamborg et al., 1968) и 30 г/л саха-

розы. Семена проращивали при температуре  $27\pm 1$  °С и интенсивности света 35 мкмоль/м<sup>2</sup>·с.

Для инокуляции эксплантов амаранта использовали культуру клеток штамма *A. tumefaciens* AGL, несущую генно-инженерную конструкцию *35S::ARL* (Kuluev et al., 2013), которую культивировали в 15 мл жидкой среды LB, содержащей рифампицин и канамицин, на орбитальном шейкере при температуре 28 °С и скорости вращения 180 об/мин. Нарращивание агробактерий продолжали до достижения оптической плотности, соответствующей концентрации  $2-3 \times 10^8$  клеток/мл (обычно около 1 суток). Полученную суспензию агробактерий центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали в эквивалентном объеме жидкой среды МС.

Из семидневных проростков в стерильных условиях вырезали сегменты семядольных листьев, гипокотилей и эпикотилей (экспланты) и культивировали в течение 6 суток на регенерационной среде МС, содержащей 13 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 1 мкМ 1-нафтилуксусной кислоты (НУК). Затем сегменты, предварительно подвергнутые поранению, погружали в бактериальную суспензию на 10 минут, после чего немного подсушивали стерильной фильтровальной бумагой и переносили на такую же регенерационную среду для сокультивации с агробактериями. В рамках всей работы было использовано 45 семядольных, 60 гипокотильных и 70 эпикотильных эксплантов.

Совместное культивирование эксплантов с агробактериями проводили в течение 2 суток, по истечении которых их промывали раствором антибиотика цефотаксима (300 мг/л) и переносили на селективную среду МС с теми же регуляторами роста (БАП и НУК) с аналогичными концентрациями и антибиотиками

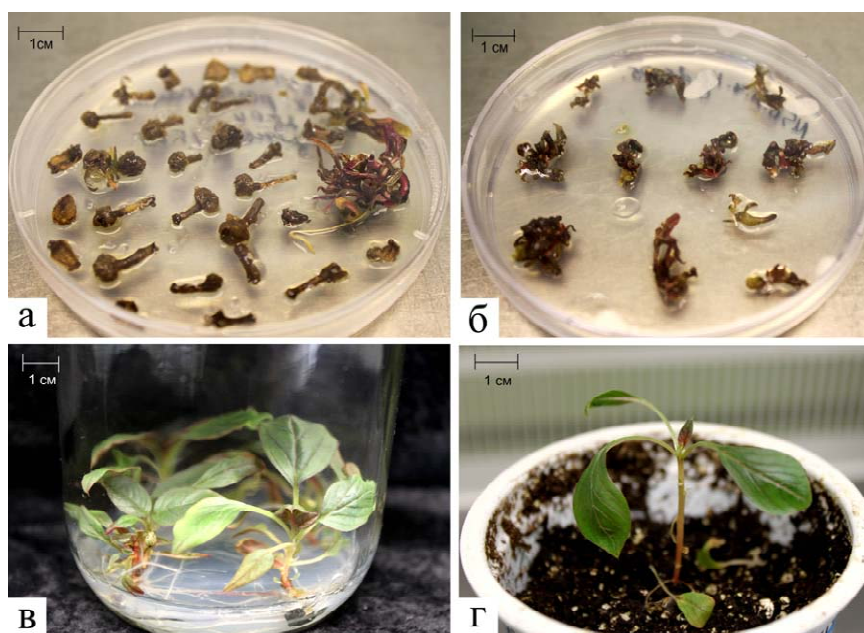


Рис. 1. Опыты по агробактериальной трансформации *A. cruentus*: а – образование каллуса на сегментах гипокотилей и регенерация побегов на сегментах эпикотилей на среде МС, содержащей 6-бензиламинопурин (БАП) и нафтилуксусную кислоту (НУК); б – регенерация побегов из сегментов эпикотилей после агробактериальной трансформации на селективной среде МС с БАП и НУК; в – укоренение на среде МС с индолилуксусной кислотой; г – акклиматизация амаранта к условиям почвы

Fig. 1. *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. cruentus*: а – the formation of callus on the hypocotyl segments and regeneration of the shoots on segments of epicotyls on MS medium with 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthylacetic acid (NAA); б – regeneration of shoots from epicotyl segments after *Agrobacterium* transformation on selective MS medium with BAP and NAA; в – rooting of shoots on MS medium with indoleacetic acid; г – acclimatization of amaranth to the soil conditions

цефотаксимом – 300 мг/л и гирномицином В (Gold Biotechnology, США) – 10 мг/л. Экспланты, на которых на селективной среде начинали регенерировать побеги, были пересажены на среду МС с 2 мкМ БАП и гирномицином В (10 мг/л) (рис. 1). Укоренение полученных в ходе работы регенерантов проводили на среде МС с добавлением 2 мкМ 3-индолилуксусной кислоты (ИУК) и гирномицина В в концентрации 10 мг/л. Укоренившиеся растения были акклиматизированы к условиям почвы и открытого воздуха. Для этого переносили амаранты в вегетационные сосуды объемом 450 мл, заполненные увлажненным универсальным грунтом Terra vita (Россия). Сверху растения накрывали прозрачными пласти-

ковыми сосудами и выращивали в условиях отсутствия дополнительного освещения при комнатной температуре. Через неделю прозрачные пластиковые сосуды убирали и переносили растения в обычные условия световой комнаты (при температуре  $27 \pm 1$  °С и интенсивности света  $35 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$ ).

Из укоренившихся на селективной среде и акклиматизированных к условиям почвы растений амаранта выделяли ДНК методом солевой экстракции (Aljanabi, Martinez, 1997) и полученные образцы подвергали ПЦР-анализу на присутствие целевого гена *ARL* и маркерных генов  $\beta$ -глюкуронидазы (*GUS*) и гирномицинофосфотрансферазы (*HPT*). Для амплификации гена *ARL* использовали праймеры

5'-ТСТАСААААСГАСАТСАТААААСАТ-3' и АСАТАААААГТГГААГААГАААААА. Для ПЦР-анализа гена *GUS* использовали праймеры 5'-ТГТГГААТТГАТСАГСГТТГГТГ-3' и 5'-ААГССГАСАГСАГСАГТТТСАТС-3' (размер ампликона 989 п.н., опт. температура отжига – 59 °С). Для идентификации гена *HPT* использовали праймеры 5'-GCTTCTGCGGGCGATTTGTG-3' и 5'-AGCTGCGCCGATGGTTTCTAC-3' (размер ампликона 786 п.н., опт. температура отжига – 60 °С). Для исключения возможной контаминации агробактериями анализируемых трансгенных растений дополнительно проводили ПЦР-анализ на наличие хромосомного гена *rpoA* *A. tumefaciens* (AF111855.1), при этом использовали праймеры 5'-ТТСТГТТГТСТТСТТСТГСГТГГТГ-3' и 5'-СГАТТСТТСТТСТГСТТСТТСТГ-3' (размер ампликона 587 п.н., опт. температура отжига – 59 °С). Электрофоретический анализ проводили в 1 %-ном агарозном геле в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI («Bio-Rad Laboratories», США).

### Результаты и обсуждение

Для данной работы по агробактериальной трансформации амаранта преимущественно были использованы эпикотильные экспланты из проростков *A. cruentus*, выращенных из стерильных семян. Выбор эпикотилей в качестве основных эксплантов объясняется тем, что наши опыты показали отсутствие регенерации побегов из гипокотильных сегментов и семядолей при использовании БАП и НУК (рис. 1а). На гипокотильях и семядольных эксплантах образовывался лишь каллус, но регенерации побегов не происходило. Поэтому при дальнейшей агробактериальной трансформации использовались сегменты эпикотилей (70 эксплантов).

За время предварительного культивирования эксплантов эпикотилей в течение 6 дней на регенерационной среде с добавлением БАП и НУК происходило увеличение размеров исходных эксплантов, видимо, благодаря наличию в среде ответственных за нормализацию процессов роста регуляторов.

Эпикотильные экспланты подвергали агробактериальной трансформации, несущей генно-инженерную конструкцию *35S::ARL*, предварительно поранив их иглой. Такой дополнительный этап работы был проведен для повышения частоты попадания бактерий в клетки амаранта. В ходе работы из эпикотильных эксплантов на селективной среде было получено 18 побегов (рис. 1б). Укоренение полученных побегов производили также на среде МС, содержащей 2 мкМ ИУК. В ходе работы укоренились 14 побегов (рис. 1в). Далее все укоренившиеся побеги были использованы для оптимизации методов акклиматизации растений к условиям почвы и открытого воздуха (рис. 1г). Из 14 укоренившихся регенератов 11 удалось акклиматизировать к условиям почвы.

Трансгенность полученных в ходе работы растений амаранта была определена методом ПЦР-анализа на наличие маркерных и целевого генов (рис. 2). ПЦР-анализ показал, что нами были получены 3 потенциальных трансгенных растения вида *A. cruentus*, несущих генно-инженерную конструкцию *35S::ARL*. Методом ПЦР было показано наличие в этих 3 растениях как целевого гена *ARL*, так и генов *HPT* и *GUS*. Процент эффективности агробактериальной трансформации *A. cruentus* при использованном нами методе составил 4 %, то есть всего 4 % обработанных агробактериями эксплантов эпикотилей дали трансгенные растения. Используемая для данной работы по трансформации сегментов эпикотилей генно-инженерная конструкция

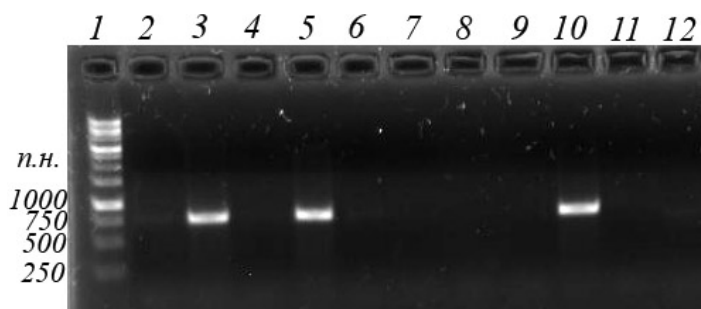


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа *A. cruentus* на наличие гена гигромицинофосфотрансферазы (*HPT*). 1 – маркер молекулярного веса 1kb (Евроген, Россия), 2-12 – акклиматизированные растения амаранта. ПЦР-положительными оказались растения под номерами 2, 4 и 9 (дорожки 3, 5 и 10 соответственно). Размер ампликона – 786 п.н.

Fig. 2. Electrophoretogram of the results of *A. cruentus* PCR analysis for the presence of hygromycin phosphotransferase gene (*HPT*). 1 – 1kb DNA Ladder (Evrogen, Russia), 2-12 – acclimatized amaranth plants. PCR-positive plants are 2, 4 and 9 (tracks 3, 5 and 10, respectively). The size of the amplicon is 786 bp.

содержит маркерный ген гигромицинофосфотрансферазы (*HPT*), продукт которого ответствен за устойчивость растений к антибиоту гигромицину. Предполагалось, что трансгенными должны быть побеги, сохранившие жизнеспособность и укоренившиеся на селективной среде с содержанием гигромицина, однако многие регенеранты оказались нетрансгенными. Возможно, для оптимизации селекции трансгенных побегов амаранта необходимо увеличение концентрации селективного антибиотика гигромицина в среде МС, использованной после сокультивирования эксплантов эпикотилей с агробактериями.

ПЦР-анализ на наличие гена *groA* *A. tumefaciens* показал его отсутствие во всех образцах ДНК анализируемых амарантов. Эти данные свидетельствуют об отсутствии агробактериальной контаминации в регенерантах амаранта, что в свою очередь доказывает трансгенность трех полученных нами растений. У двух трансгенных растений удалось получить семена, однако они оказались невсхожими. Мы полагаем, что невсхожесть семян связана не с генетической трансфор-

мацией, а с условиями выращивания амаранта. В предыдущих работах с амарантом *A. cruentus* нам так же не удавалось получить всхожие семена этого растения при выращивании в лабораторных условиях. Однако те же растения давали полноценные семена при выращивании на открытом грунте. Вероятнее всего это связано с недостатком интенсивности света, так как амарант относится к светолюбивым растениям.

Ранее уже была показана эффективность использования эксплантов эпикотилей амаранта *Amaranthus tricolor* при агробактериальной трансформации (Pal et al., 2013). При этом авторы использовали бинарный вектор, несущий ген неомицинофосфотрансферазы. Новизна нашей работы заключается в том, что мы впервые показали возможность агробактериальной трансформации вида *A. cruentus*, при этом впервые для амаранта был использован бинарный вектор, несущий ген гигромицинофосфотрансферазы. Исходя из этих данных, можно предполагать, что использование сегментов эпикотилей при агробактериальной трансформации может оказаться эффективным для многих видов амаранта. При этом

могут быть использованы бинарные векторы с генами устойчивости как к канамицину, так и гигромицину.

### Заключение

Нами впервые проведена агробактериальная трансформация амаранта *A. cruentus*

и оптимизирован протокол создания трансгенных растений этого вида амаранта с использованием гигромицина в качестве селективного агента. Наиболее оптимальным для агробактериальной трансформации *A. cruentus* является использование сегментов эпикотилей.

### Благодарности / Acknowledgements

Исследования были проведены в рамках государственных заданий № АААА-А16-116020350028-4 и № АААА-А19-119021190011-0 с использованием оборудования РЦКП «Агидель» и УНУ «КОДИНК».

The research was carried out within the framework of state assignment № АААА-А16-116020350028-4 and № АААА-А19-119021190011-0 using the equipment of RCCU «Agidel» and USI «KODINK»

### Список литературы / References

Жужукин В.И., Шор М.Ф. (2010) Изменчивость содержания питательных веществ при интродукции амаранта в Нижнем Поволжье. *Кормопроизводство*, 11: 28-31 [Zhuzhukin V.I., Shor M.F. (2010) Changeability of nutrients content during the process of amaranth introduction in Lower Volga region. *Fodder Production* [Kormoproizvodstvo], 11: 28-31 (in Russian)]

Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г. (2015) Регуляция роста клеток растяжением в растениях. *Успехи современной биологии*, 135(2): 148-163 [Kuluev B.R., Safullina M.G. (2015) Regulation of cell expansion in plants. *Advances in Modern Biology* [Uspekhi sovremennoj biologii], 135(2): 148-163 (in Russian)]

Магомедов И.М., Чиркова Т.В. (2015) Амарант – прошлое, настоящее и будущее. *Успехи современного естествознания*, 1-7: 1108-1113 [Magomedov I.M., Chirkova T.V. (2015) Amaranth – past, present and future. *Advances in Current Natural Sciences* [Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya], 1-7: 1108-1113 (in Russian)]

Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. (2015) Создание трансгенного рапса (*Brassica napus* L.) с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE Arabidopsis thaliana* методом погружения цветков. *Биотехнология*, 5: 49–58 [Mikhaylova E.V., Kuluev B.R. (2015) Construction of transgenic rape (*Brassica napus* L.) overexpressing *ARGOS-LIKE* gene from *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Biotechnology in Russia*, 5: 49–58 (in Russian)]

Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. (2015) Амарант: особенности культуры, применение, перспективы возделывания в России и создания трансгенных отечественных сортов. *Биомика*, 7(4): 284–299 [Taipova R.M., Kuluev B.R. (2015) Amaranth: features of culture, prospects of cultivation in Russia and generation of transgenic Russian varieties. *Biomics* [Biomika], 7(4): 284-299 (in Russian)]

Aljanabi S.M., Martinez I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22): 4692– 4693

Feng G., Qin Z., Yan J., Zhang X., Hu Y. (2011) Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED1 regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL. *New Phytologist*, 191(3): 635–646

Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1): 151–158

Gonzalez N., Vanhaeren H., Inze D. (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in Plant Sciences*, 17(6): 332–340

Hu Y., Poh H.M., Chua N.H. (2006) The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth. *The Plant Journal*, 47(1): 1–9

Hu Y., Xie Q., Chua N.H. (2003) The Arabidopsis auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *The Plant Cell*, 15(9): 1951–1961

Jofre-Garfias A.E., Villegas-Sepúlveda N., Cabrera-Ponce J.L., Adame-Alvarez R.M., Herrera-Estrella L., Simpson J. (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light- and tissue-specific expression of a pea chlorophyll a/b-binding protein promoter. *Plant Cell Reports*, 16(12): 847-852

Kuluev B.R., Knyazev A.V., Safiullina M.G., Chemeris A.V. (2013) Effect of constitutive expression of *ARGOS-LIKE* gene on sizes of cells and organs of transgenic tobacco plants. *Russian Journal of Genetics*, 49(5): 503-510

Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Taipova R.M., Chemeris A.V. (2017) Changes in phenotype of transgenic amaranth *Amaranthus retroflexus* L., overexpressing *ARGOS-LIKE* gene. *Russian Journal of Genetics*, 53(1): 67-75

Munusamy U., Abdullah S.N.A., Aziz M.A., Khazaai H. (2013) Female reproductive system of *Amaranthus* as the target for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(2): 188–192

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497

Murugan S.B., Sathishkumar R. (2016) Establishment of high frequency callus induction and genetic transformation in neglected leafy vegetable *Amaranthus trisis*. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 3(1): 1058

Pal A., Swain S.S., Das A.B., Mukherjee A.K., Chand P.K. (2013) Stable germ line transformation of a leafy vegetable crop amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49(2): 114-128

Qin Z., Zhang X., Zhang X., Feng G., Hu Y. (2014) The Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED 2 is involved in regulation of cell expansion during organ growth. *BMC Plant Biology*, 14: 349

Shi J., Habben J.E., Archibald R.L., Drummond B.J., Chamberlin M.A., Williams R.W., Lafitte H.R., Weers B.P. (2015) Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both Arabidopsis and Maize. *Plant Physiology*, 169(1): 266-282



DOI 10.17516/1997-1389-0317

УДК 574.52

**Effect of the Level of Irradiance on Growth  
and Content of Photosynthetic Pigments  
of Canadian Elodea (*Elodea canadensis*)  
in Model System “Water-Bottom Sediments”**

**Yuliyana V. Aleksandrova<sup>a</sup>,  
Tatiana A. Zotina<sup>\*a,b</sup> and Nikolay A. Gaevsky<sup>b</sup>**

*<sup>a</sup>Institute of Biophysics*

*FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

*<sup>b</sup>Siberian Federal University*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 27.03.2019, received in revised form 23.10.2019, accepted 25.12.2019, published online 30.04.2020

**Abstract.** Bioassays based on aquatic plants are a convenient tool for studying the quality of bottom sediments. One of the stages in the development of a bioassay is the selection of optimal growth conditions for indicator plants in a model test system. Response of indicator physiological endpoints of Canadian waterweed (*Elodea canadensis*) to light flux density was investigated to determine optimal irradiance level in a “water – sediment” model system, proposed previously for contact bioassay of natural bulk bottom sediments. Based on the response of shoot and root growth (length and weight), and concentration and ratio of photosynthetic pigments (chl. *a*, chl. *b*, and carotenoids) of *Elodea* to the change of light flux density, no limitation or inhibition of growth and photosynthesis of *Elodea* was revealed at light flux density from 56 to 143  $\mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Hence, the level of irradiance within this range can be recommended for use in the experimental system proposed for bioassay of bulk bottom sediments using *E. canadensis* as an indicator.

**Keywords:** bioassay, bottom sediment, aquatic plant, shoot length, root length, photosynthetic pigments, light saturation.

Citation: Aleksandrova Yu.V., Zotina T.A., Gaevsky N.A. Effect of the level of irradiance on growth and content of photosynthetic pigments of Canadian Elodea (*Elodea canadensis*) in model system “water-bottom sediments”. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(2), 188-196. DOI: 10.17516/1997-1389-0317

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: t\_zotina@ibp.ru

ORCID: 0000-0002-4274-963X (Aleksandrova Yu.); 0000-0002-4792-1582 (Zotina T.); 0000-0002-3747-9858 (Gaevsky N.)

# Влияние светового фактора на рост и содержание фотосинтетических пигментов элодеи канадской (*Elodea canadensis*) в модельной системе «вода-донные отложения»

Ю.В. Александрова<sup>а</sup>, Т.А. Зотина<sup>а,б</sup>, Н.А. Гаевский<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Институт биофизики  
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»  
Российская Федерация, Красноярск  
<sup>б</sup>Сибирский федеральный университет  
Российская Федерация, Красноярск

**Аннотация.** Биотесты на основе водных растений являются удобным инструментом для изучения качества донных отложений. Один из этапов разработки биотеста – подбор оптимальных условий для роста индикаторных растений в модельной тест-системе. В настоящей работе оценивалось влияние уровня освещенности на индикаторные физиологические показатели водного растения элодеи канадской (*Elodea canadensis*) с целью подбора оптимального уровня освещенности в модельной системе «вода-донные отложения», предложенной ранее для контактного тестирования цельных донных отложений. Анализ реакции показателей роста побегов и корней элодеи (длины и веса), а также содержания и соотношения фотосинтетических пигментов (хл. *a*, хл. *b*, каротиноидов) на изменение уровня освещенности позволяет выделить диапазон светового потока от 56 до 143 мкмоль · м<sup>2</sup> · с<sup>-1</sup>, в котором не происходит светового лимитирования и ингибирования роста и фотосинтеза элодеи канадской. Следовательно, уровень освещенности из выделенного диапазона рекомендуется использовать в модельной системе, предложенной для биотестирования донных отложений с использованием элодеи канадской в качестве индикатора.

**Ключевые слова:** биотестирование, донные отложения, водное растение, длина побега, длина корня, фотосинтетические пигменты, световое насыщение.

Цитирование: Александрова, Ю.В. Влияние светового фактора на рост и содержание фотосинтетических пигментов элодеи канадской (*Elodea canadensis*) в модельной системе «вода-донные отложения» / Ю.В. Александрова, Т.А. Зотина, Н.А. Гаевский // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 188-196. DOI: 10.17516/1997-1389-0317

## Введение

Элодея канадская (*Elodea canadensis* Michx.) – инвазивный вид, натурализовавшийся в пресных водоемах Евразии, в том числе в р. Енисей (Зотина, 2013; 2014). *E. canadensis* широко используется как индикатор техногенного загрязнения природных водоемов (Samec-

ka-Cymerman, Kempers, 2003; Болсуновский и др., 2007; Krems et al., 2013; Muratova et al., 2014; Medvedeva et al., 2014), а также для целей биотестирования (Girling et al., 2000; Knauer et al., 2006; McGregor et al., 2008; Arts et al., 2008; Brain et al., 2012; Zotina et al., 2014; 2015; Koca et al., 2018). Ранее нами была предложена мо-

дельная система для контактного тестирования природных цельных донных отложений с использованием элодеи канадской в качестве индикаторного вида (Zotina et al., 2014; 2015). Индикаторные показатели элодеи канадской (длина побегов, длина корней, вес побегов, содержание хлорофилла) проявляют разную чувствительность к токсикантам и характеризуются разной вариабельностью (Arts et al., 2008; Brain et al., 2012; Zotina et al., 2015). Как фототрофный организм, элодея канадская чувствительна к качественным (спектральному составу) и количественным (уровню освещенности, фотопериоду) характеристикам света, что проявляется в изменении показателей ее роста и фотосинтеза (Lichtenthaler et al., 1981; Wolff, Senger, 1991; Madsen, Sand-Jensen, 1994; Riis et al., 2012; Eller et al., 2015). Поэтому в данной работе исследовалась зависимость физиологических параметров элодеи канадской (показателей роста побегов и корней, содержания фотосинтетических пигментов в побегах) от уровня освещенности с целью подбора оптимального светового режима для растения в модельной системе «вода-донные отложения», предложенной нами ранее для контактного биотестирования цельных донных отложений.

### Материалы и методы

Побеги элодеи канадской отбирали в р. Енисей в сентябре со стороны левого берега, на 13,5 км выше речного вокзала г. Красноярска, одновременно была отобрана проба воды для химического анализа. Растения были привезены в лабораторию и акклиматизировались в емкости объемом 40 л, наполненной водопроводной водой комнатной температуры (22-23 °С), при освещении люминесцентными лампами холодного белого спектра в течение 16 часов в сутки при уровне поверхностной освещенности около 4 кЛк. Растения ежеднев-

но перемешивали, воду меняли по мере необходимости. Для эксперимента брали апикальные побеги длиной 4 см одинаковые по форме и размеру листьев, отросшие в лаборатории. Для первого эксперимента использовали растения после акклиматизации в течение 8 суток, для второго – после 25 суток. Средний сухой вес побега элодеи в начале первого эксперимента составлял  $0,021 \pm 0,003$  г, в начале второго –  $0,014 \pm 0,004$  г. В качестве субстрата использовали искусственные донные отложения (ДО), приготовленные по протоколу Организации экономического сотрудничества и развития (OECD, Guidline 219), как описано нами ранее (Zotina et al., 2015). В стеклянные стаканы объемом 650 мл, диаметром 6,5 см помещали по 260 г сырых ДО, объем которых составлял около 150 мл, присыпали крупным песком. Поверх ДО наливали 450 мл водопроводной воды, отфильтрованной через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм (45 мм диам., GSWP, Millipore). Воду наливали по пластиковому шпателью, чтобы минимизировать взмучивание ДО. Через сутки в ДО высаживали побеги элодеи канадской по 7 штук на стакан, на равном расстоянии друг от друга по периметру, с помощью стеклянной палочки. Дистальную часть побегов помещали в субстрат на глубину около 1 см. Перед высадкой растений величина pH воды в стаканах составляла 7,5. Стаканы с растениями освещали сверху люминесцентными лампами холодного белого спектра (FSLYZ18RRT8/765) в течение 16 часов в сутки. Уровни освещенности на поверхности воды составляли 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 и 10,2 кЛк, что соответствовало поверхностной плотности потока квантов 7; 14; 28; 56; 84; 112 и 143  $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . В первом оценочном эксперименте использовали более короткий диапазон уровней освещенности: 14; 28; 56 и 84  $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Темновой контроль создавали, оборачивая стакан алюминиевой

фольгой со всех сторон. На каждый уровень освещенности приходился один стакан с растениями. Эксперимент проводили в термостатируемом помещении. Температура воды в стаканах составляла 21-22 °С. Ежедневно стаканы поворачивали вокруг своей оси на 90°, чтобы выровнять освещенность побегов, измеряли температуру и рН воды, потери воды за счет испарения компенсировали дистиллированной водой (около 20 мл в сутки). Через 10 суток после посадки растения вынимали из ДО, измеряли длину побегов, длину корней, взвешивали после высушивания в темноте при комнатной температуре. Содержание влаги в биомассе побегов элодеи в начале экспериментов составило  $90,8 \pm 0,6$  %. Для экстракции пигментов использовали по три побега на каждый уровень освещенности. Пигменты экстрагировали 96%-м этиловым спиртом из целых побегов, высушенных в темноте при комнатной температуре до постоянного веса и растертых в порошок в керамической ступке. Оптическую плотность в экстрактах измеряли с помощью спектрофотометра (Specol 1300, Analytic Jena, Germany), концентрацию хлорофиллов *a* (хл. *a*) и *b* (хл. *b*) и суммы каротиноидов (кар.) в экстракте рассчитывали согласно (Lichtenthaler, 1987; Lichtenthaler, Buschmann, 2001). Содержание металлов в воде измеряли с помощью ИСП-спектрометра (ICP-OES; iCAP 6300 Duospectrometer, Thermo Electron Manufacturing), как описано ранее (Zotina et al., 2015). Результаты измерений представлены как арифметические средние величины со стандартным отклонением.

Относительную скорость роста (ОСР) элодеи рассчитывали по формуле:

$$\text{ОСР (сут}^{-1}\text{)} = \ln(X/X_0)/t,$$

где  $X_0$  и  $X$  – сухой вес побегов в начале и конце эксперимента,  $t$  – длительность эксперимента в сутках.

Достоверность влияния светового фактора оценивали с помощью однофакторного анализа (ANOVA) с последующим LSD и HSD анализом на уровне значимости  $p < 0,05$  в программе Statistica 8.0. Коэффициенты варибельности (CV, %) индикаторных параметров элодеи рассчитывали как отношение стандартного отклонения среднего к средней величине параметра и выражали в %.

## Результаты и обсуждение

Фильтрованная водопроводная вода, использованная в экспериментах, может быть классифицирована как умеренно жесткая, 63,5 ppm (Ca,  $20,3 \pm 0,3$  мг/л; Mg,  $3,1 \pm 0,1$  мг/л,  $n=3$ ). В воде зарегистрированы незначительные количества потенциально токсичных металлов и биогенных элементов (мг/л,  $n=3$ ): Cu –  $0,03 \pm 0,01$ ; Zn –  $0,054 \pm 0,029$ ; Pb –  $0,001 \pm 0,000$ ; P –  $0,007 \pm 0,001$ ; N ( $\text{NH}_4$ ) –  $0,11 \pm 0,01$ , не превышающие ПДК для питьевой воды. Содержание катионов жесткости в воде р. Енисей в месте отбора элодеи для эксперимента (18,2 мг/л Ca и 2,8 мг/л Mg) было аналогичным их содержанию в водопроводной воде.

За время эксперимента в темновом контроле листья на дистальной части побегов утратили пигменты, но побеги удлинились в среднем в 1,3 раза; на свету побеги удлинились в 1,7-2,4 раза по сравнению с их начальной длиной (рис. 1а). На большинстве побегов выросли боковые ответвления, вклад которых в суммарную длину побегов составлял до 28 % в первом эксперименте и 11-24 % – во втором. В темновом контроле корни на побегах элодеи не появились. Число и длина корней на побеге увеличивались при возрастании уровня освещенности до  $14 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (рис. 1б). При минимальной освещенности ( $7 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) в среднем выросло по 0,7 корня на побег, при более высокой – 1,2-1,8 корня на побег.

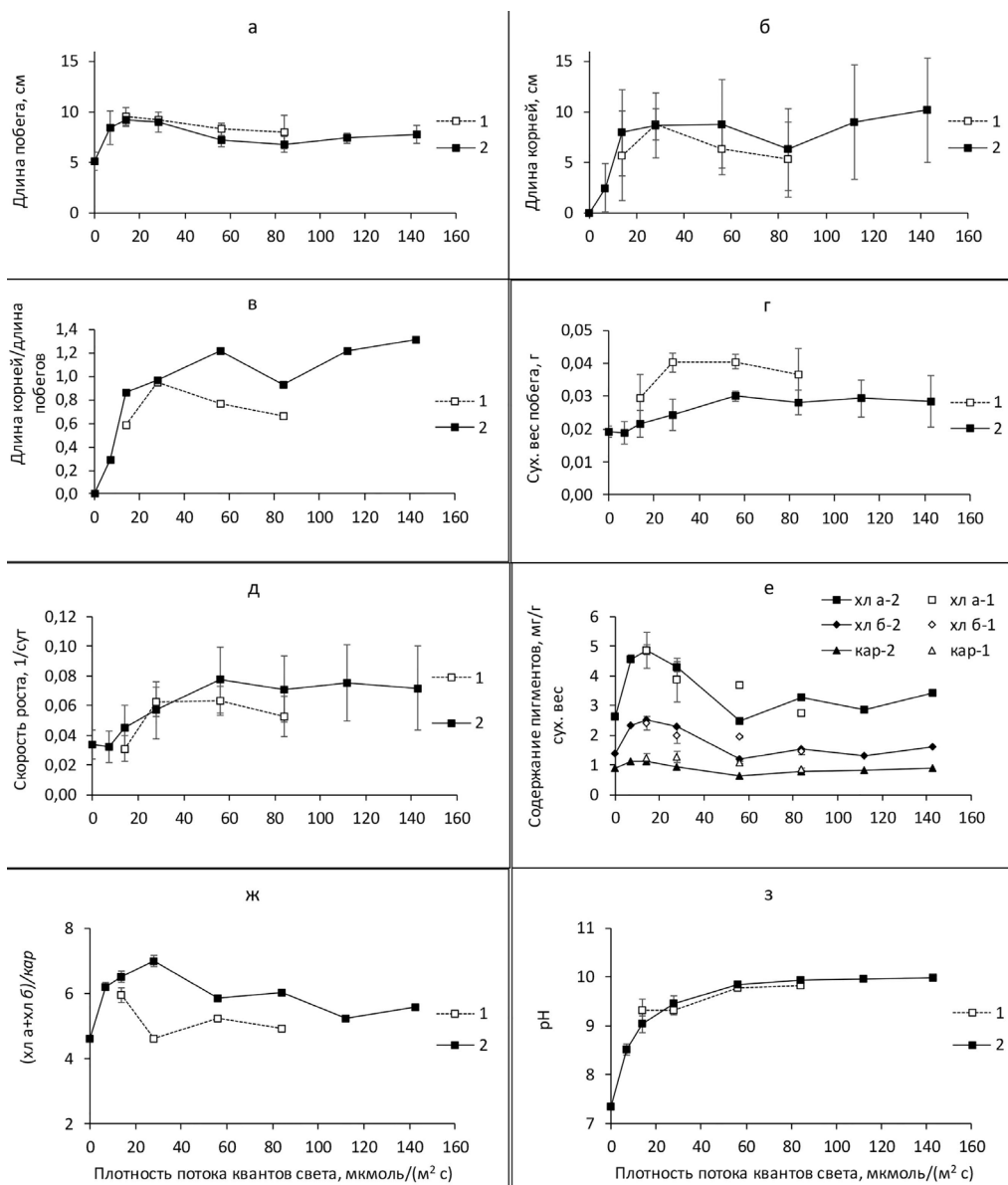


Рис. 1. Показатели роста и фотосинтетической активности *E. canadensis* в эксперименте в зависимости от плотности потока квантов света (среднее±SD): а – длина побега, см; б – суммарная длина корней на побега, см; в – отношение длины корня к длине побега; г – сухой вес побега, г; д – относительная скорость роста биомассы побега, 1/сут; е – содержание фотосинтетических пигментов в сухой биомассе побега, мг/г; ж – отношение содержания суммы хл. а и хл. б к содержанию каротиноидов в сухой биомассе побега; з – средняя величина рН на 3-10 сутки эксперимента. Цифрами 1 и 2 обозначены эксперименты, проведенные с разницей в 2,5 недели. На каждом уровне освещенности использовалось по семь побегов элодеи, для анализа пигментов использовалось по три побега

Fig. 1. The growth and photosynthetic activity endpoints of *E. canadensis* in the experiment, depending on the density of the flux of light quanta (mean±SD): а – shoot length, cm; б – total length of roots on the shoot, cm; в – the ratio of root length to shoot length; г – dry shoot weight, g; д – relative growth rate of shoot biomass, 1/day; е – the content of photosynthetic pigments in the dry shoot biomass, mg/g; ж – the ratio of the content of the sum of chl. a and chl. b to the content of carotenoids in the dry shoot biomass; з – the average pH at 3-10 days of the experiment. Numbers 1 and 2 indicate experiments conducted with an interval of 2.5 weeks. At each irradiation level, seven shoots of *Elodea* were used; for analysis of pigments, three shoots were used

Суммарная длина корней превышала длину побегов на 29-131 % (рис. 1в). Прирост биомассы побегов за время эксперимента составил 36-117 % (рис. 1г). Относительная скорость роста (ОСР) биомассы побегов вышла на насыщение при плотности потока квантов света 28 и 56 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> в первом и втором экспериментах, соответственно (рис. 1д). Более высокая ОСР биомассы побегов (до 0,077±0,022 сут<sup>-1</sup>) зарегистрирована во втором эксперименте. Повышенное содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) было зарегистрировано при плотности потока квантов 7-28 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>, по сравнению с содержанием пигментов при более высоких уровнях освещенности (рис. 1е). Отношение содержания суммы хлорофиллов к содержанию каротиноидов было также выше при более низкой освещенности (рис. 1ж). Величина рН воды достигла стационарного равновесного значения на вторые-третьи сутки эксперимента при всех уровнях освещенности, что позволило нам усреднить величины рН в период с третьих по восьмые сутки. Полученная таким образом равновесная величина рН, которую можно рассматривать как косвенный показатель интенсивности фотосинтеза элодеи, вышла на насыщение при плотности потока квантов света в диапазоне 28-56 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> (рис. 1з).

Относительная скорость роста биомассы побегов элодеи достигла светового насыщения при интенсивности светового потока между 28 и 56 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> (рис. 1д), что соответствует данным, полученным в работе (Madsen, Sand-Jensen, 1994). В этом же диапазоне освещенности наблюдался выход на насыщение уровня рН (рис. 1з). Содержание фотосинтетических пигментов в побегах элодеи статистически значимо ( $p < 0,05$ ) возросло с увеличением светового потока и

достигло максимума при 14 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>. При дальнейшем повышении уровня освещенности содержание пигментов снизилось и вышло на стационарный уровень при освещенности 56 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> (рис. 1е). Также в диапазоне освещенности 7-28 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> наблюдалось статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение длины побегов элодеи (рис. 1а). Увеличение длины побегов и содержания фотосинтетических пигментов при относительно низких освещенностях (7, 14 и 28 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>) в наших экспериментах мы можем объяснить недостатком световой энергии, принимая во внимание снижение вышеуказанных параметров при более высоких уровнях освещенности (56 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> и более) (рис. 1а,е). Таким образом, уровень освещенности около 60 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> можно считать близким к оптимуму для элодеи канадской, и запасенной при этом энергии достаточно для нормального роста и развития растения. Наше предположение согласуется с данными, опубликованными в работе (Lichtenthaler et al., 1981), где показано, что при достаточном уровне освещенности содержание хлорофиллов и отношение содержания хлорофиллов к содержанию каротиноидов в листьях растений снижаются.

При биотестировании донных отложенный вес побегов считается основным индикатором роста погруженных макрофитов, в том числе в силу наименьшей вариабельности этого показателя по сравнению с другими показателями их роста (Knauer et al., 2006; Feiler et al., 2013). Из числа исследованных нами физиологических индикаторов элодеи канадской длина побега, вес побега и содержание хл. *a* имели близкую по величине вариабельность (табл.), приемлемую для индикаторных параметров при биотестировании (Knauer et al., 2006; Feiler et al., 2013). Вариабельность

Таблица. Вариабельность (CV, %) индикаторных показателей роста и фотосинтеза *E. canadensis* в эксперименте с восемью уровнями освещенности в диапазоне 0-143 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>

Table. Variability (CV, %) of indicator endpoints of growth and photosynthesis of *E. canadensis* in an experiment with eight levels of irradiance in the range of 0-143  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Индикатор	Коэффициент вариабельности, CV, %	
	Диапазон величин	Среднее±SD (n=8)
Длина побега	11,1-25,4	16,7±5,1
Длина корня	36,9-97,5	59,5±19,1
Вес побега	4,7-27,7	17,4±6,9
Содержание хл. <i>a</i>	7,3-41,3	18,0±12,2

длины корней была в три раза больше, чем вариабельность других физиологических показателей элодеи канадской. Другие авторы также отмечают большую чувствительность длины корней к качеству окружающей среды (Arts et al., 2008; Zotina et al., 2015), по сравнению с показателями роста побегов, а также большую вариабельность показателей роста корней.

### Заключение

Анализ реакции показателей роста побегов и корней элодеи канадской, а также

содержания и соотношения фотосинтетических пигментов в биомассе побегов растения на изменение уровня освещенности позволяет выделить диапазон светового потока от 56 до 143 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>, в котором не происходит лимитирования и ингибирования роста и фотосинтеза элодеи канадской. Следовательно, уровень освещенности из выделенного диапазона рекомендуется использовать в модельной системе, предложенной для биотестирования донных отложений с использованием элодеи канадской в качестве индикатора.

### Благодарности / Acknowledgements

Авторы благодарят О.В. Анищенко (Институт биофизики СО РАН) за химический анализ проб воды, а также анонимных рецензентов за ценные замечания и предложения.

The authors are grateful to O.V. Anishchenko (Institute of Biophysics SB RAS) for chemical analysis of water samples and to anonymous reviewers for valuable comments and suggestions.

### Список литературы / References

Болсуновский А.Я., Муратова Е.Н., Суковатый А.Г., Пименов А.В., Санжараева Е.А., Зотина Т.А., Седельникова Т.С., Паньков Е.В., Корнилова М.Г. (2007) Радиоэкологический мониторинг реки Енисей и цитогенетические характеристики водного растения *Elodea canadensis*. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 47(1): 63-73 [Bolsunovsky A.Ya., Muratova E.N., Sukovaty A.G., Pimenov A.V., Sanzharaeva E.A., Zotina T.A., Sedelnikova T.S., Pankov E.V., Kornilova M.G. (2007) Radioecological monitoring of the Yenisei River and cytological characterization of a submerged aquatic plant *Elodea canadensis*. *Radiation Biology. Radioecology* [Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya], 47(1): 63–73 (in Russian)]

Зотина Т.А. (2013) Находка бразильской элодеи *Egeria densa* Planch. (Hydrocharitaceae) в реке Енисей. *Turczaninowia*, 16(3): 60-63 [Zotina T.A. (2013) Finding of Brazilian elodea *Egeria densa* Planch. (Hydrocharitaceae) in the Yenisei River. *Turczaninowia*, 16(3): 60-63 (in Russian)]

Зотина Т.А. (2014) Фитомасса и видовое разнообразие макрофитной растительности в среднем течении р. Енисей. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*, 7(1): 73-86 [Zotina T.A. (2014) Phytomass and specific diversity of macrophyte vegetation in the middle reach of the Yenisei River. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 7(1): 73-86 (in Russian)]

Arts G.H.P., Belgers J.D.M., Hoekzema C.H., Thissen J.T.N.M. (2008) Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environmental Pollution*, 153(1): 199-206

Brain R.A., Hoberg J., Hosmer A.J., Wall S.B. (2012) Influence of light intensity on the toxicity of atrazine to the submerged freshwater aquatic macrophyte *Elodea canadensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79: 55-61

Eller F., Alnooe A.B., Boderskov T., Guo W.-Y., Kamp A.T., Sorrell B.K., Brix H. (2015) Invasive submerged freshwater macrophytes are more plastic in their response to light intensity than to the availability of free CO<sub>2</sub> in air-equilibrated water. *Freshwater Biology*, 60(5): 929-943

Feiler U., Höss S., Ahlf W., Gilbert D., Hammers-Wirtz M., Hollert H., Meller M., Neumann-Hensel H., Ottermanns R., Seiler T.B., Spira D., Heininger P. (2013) Sediment contact tests as a tool for the assessment of sediment quality in German waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(1): 144-155

Girling A.E., Pascoe D., Janssen C.R., Peither A., Wenzel A., Schäfer H., Neumeier B., Mitchell G.C., Taylor E.J., Maund S.J., Lay J.P., Jüttner I., Crossland N.O., Stephenson R.R., Persoone G. (2000) Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(2): 148-176

Knauer K., Vervliet-Scheebaum M., Dark R.J., Maund S.J. (2006) Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants. *Pest Management Science*, 62(8): 715-722

Koca F.D., Yilmaz D.D., Duman F., Ocoy I. (2018) Comparison of phytotoxic effects of bio-synthesised copper oxide nanoparticle and ionic copper on *Elodea canadensis*. *Chemistry and Ecology*, 34(9): 839-853

Krems P., Rajfur M., Waclawek M., Kłos A. (2013) The use of water plants in biomonitoring and phytoremediation of waters polluted with heavy metals. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 20(2): 353-370

Lichtenthaler H.K., Buschmann C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1): F4.3.1–F4.3.8

Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382

Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Doll M., Fietz H.J., Bach T., Kozel U., Meier D., Rahmsdorf U. (1981) Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research*, 2(2): 115-141

Madsen T.V., Sand-Jensen K. (1994) The interactive effects of light and inorganic carbon on aquatic plant growth. *Plant, Cell and Environment*, 17(8): 955-962



McGregor E.B., Solomon K.R., Hanson M.L. (2008) Effects of planting system design on the toxicological sensitivity of *Myriophyllum spicatum* and *Elodea canadensis* to atrazine. *Chemosphere*, 73(3): 249-260

Medvedeva M.Yu., Bolsunovsky A.Ya., Zotina T.A. (2014) Cytogenetic abnormalities in aquatic plant *Elodea canadensis* in anthropogenic contamination zone of Yenisei River. *Contemporary Problems of Ecology*, 7(4): 422-432

Muratova E.N., Goryachkina O.V., Kornilova M.G., Pimenov A.V., Sedelnikova T.S., Bolsunovsky A.Ya. (2014) Cytogenetic studies on submerged plants from the Yenisei River area in the zone of radioactive contamination. *Biology Bulletin*, 41(5): 461-467

Riis T., Olesen B., Clayton J.S., Lambertini C., Brix H., Sorrell B.K. (2012) Growth and morphology in relation to temperature and light availability during the establishment of three invasive aquatic plant species. *Aquatic Botany*, 102: 56-64

Samecka-Cymerman A., Kempers A.J. (2003) Biomonitoring of water pollution with *Elodea canadensis*. A case study of three small Polish rivers with different levels of pollution. *Water, Air, and Soil Pollution*, 145: 139-153

Wolff B., Senger H. (1991) Adaptation of the photosynthetic apparatus of aquatic higher-plants to various light-conditions. *Journal of Plant Physiology*, 138(3): 358-362

Zotina T., Medvedeva M., Trofimova E., Alexandrova Yu., Dementyev D., Bolsunovsky A. (2015) Chromosomal abnormalities in roots of aquatic plant *Elodea canadensis* as a tool for testing genotoxicity of bottom sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122: 384-391

Zotina T.A., Trofimova E.A., Bolsunovsky A.Ya., Anishenko O.V. (2014) Experimental estimation of the possible use of submersed macrophytes for biotesting bottom sediments of the Yenisei River. *Contemporary Problems of Ecology*, 7(4): 410-421

DOI 10.17516/1997-1389-0323

УДК 630.18+630.16

## **Xylogenesis of Scots Pine in an Uneven-Aged Stand of the Minusinsk Depression (Southern Siberia)**

**Marina V. Fonti<sup>a\*</sup>, Elena A. Babushkina<sup>b</sup>,  
Dina F. Zhirnova<sup>b</sup> and Eugene A. Vaganov<sup>a,c</sup>**

*<sup>a</sup>Siberian Federal University*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

*<sup>b</sup>Khakass Technical Institute, Siberian Federal University*

*Abakan, Russian Federation*

*<sup>c</sup>V.N. Sukachev Institute of Forest SB RAS*

*FRC "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 23.01.2019, received in revised form 13.05.2020, accepted 27.05.2020

**Abstract.** Tree-ring formation studies are important for assessing the impact of environmental factors on tree growth at intra-seasonal resolution. This information is necessary for understanding plant acclimatization to current and expected climate changes. Little is still known about how tree age may affect the duration and rate of annual ring formation. In this study, we investigated tree-ring formation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees of different ages (30- and 95-year-old trees) from the forest-steppe zone in Southern Siberia. The main objectives were 1) to estimate the timing of cambial activity by distinguishing the phases of division, enlargement, wall thickening, and maturation of tracheids and 2) to compare the anatomical structure of the tracheids forming the annual rings of the differently aged trees. Stem tissue was sampled weekly from April to September 2014. The results showed a 1-2 week difference in duration of the phases of xylem formation between the groups; in addition, the ring width of the young trees was slightly narrower. The size of the tracheids of the entirely formed ring (i.e. the results of the enlargement phase) did not differ between the groups whereas the dynamics of the cell-wall thickness showed significant differences. The data obtained in the present study can provide references to calibrate process-based models linking environment to wood formation. These data can be used to benchmark time-explicit simulated measurements of annual ring increment and cell anatomical structure against the corresponding parameters of mature trees growing under natural conditions.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: mbryukhanova@sfu-kras.ru

ORCID: 0000-0002-2415-8019 (Fonti M.); 0000-0002-1355-4307 (Babushkina E.); 0000-0002-5189-5700 (Zhirnova D.); 0000-0001-9168-1152 (Vaganov E.)

**Keywords:** *Pinus sylvestris*, xylem, cambial activity, radial tree-growth, wood anatomical features.

---

Citation: Fonti M.V., Babushkina E.A., Zhirnova D.F., Vaganov E.A. Xylogenesis of Scots Pine in an uneven-aged stand of the Minusinsk Depression (Southern Siberia). J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(2), 197-207. DOI: 10.17516/1997-1389-0323

---

## **Особенности ксилогенеза сосны обыкновенной в разновозрастном древостое Минусинской котловины (Южная Сибирь)**

**М.В. Фонти<sup>а</sup>, Е.А. Бабушкина<sup>б</sup>,  
Д.Ф. Жирнова<sup>б</sup>, Е.А. Ваганов<sup>а,в</sup>**

*<sup>а</sup>Сибирский федеральный университет  
Российская Федерация, Красноярск*

*<sup>б</sup>Хакасский технический институт, филиал  
Сибирского федерального университета  
Российская Федерация, Абакан*

*<sup>в</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН  
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»  
Российская Федерация, Красноярск*

---

**Аннотация.** Исследования сезонного формирования ксилемы годичных колец деревьев позволяют оценивать влияние факторов среды на рост древесных растений с высоким временным разрешением и скорость их адаптации к текущим и ожидаемым изменениям климата. Все еще недостаточно изученным является вопрос, как возраст деревьев может влиять на скорость их роста и продолжительность ксилогенеза. В связи с этим целью нашего исследования было установить особенности сезонного формирования годичных колец сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающей в зоне лесостепи Южной Сибири, для деревьев двух возрастных групп (30 и 95 лет) и получить данные о продолжительности камбиальной активности, растяжении трахеид, утолщении их клеточной стенки и появлении зрелых трахеид в кольце, а также сопоставить анатомическую структуру образованных годичных колец у деревьев разного возраста. Отбор сезонных образцов проводили еженедельно в течение 2014 г. с апреля по сентябрь. Результаты исследования показали, что длительность различных фаз формирования ксилемы у этих групп отличалась на 1-2 недели, при этом в течение сезона роста у молодых деревьев сформировалось более узкое кольцо с меньшим числом клеток по сравнению со старыми деревьями. Радиальные размеры трахеид полностью сформированного кольца у двух групп деревьев оставались практически одинаковыми, тогда как динамика толщины клеточной стенки показала значимые различия. Полученные данные могут быть использованы в дальнейшем как входящие параметры имитационных моделей роста древесных растений и позволят получить биологически обусловленную согласованность между измеренной и имитационной величинами годичного прироста и анатомической структуры ксилемы.

**Ключевые слова:** *Pinus sylvestris*, ксилема, камбиальная активность, радиальный прирост деревьев, анатомические параметры древесины.

Цитирование: Фонти, М.В. Особенности ксилогенеза сосны обыкновенной в разновозрастном древостое Минусинской котловины (Южная Сибирь) / М.В. Фонти, Е.А. Бабушкина, Д.Ф. Жирнова, Е.А. Ваганов // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 197-207. DOI: 10.17516/1997-1389-0323

## Introduction

The effect of short-term climatic fluctuations (including weather anomalies) on the tree-ring growth and productivity of tree species can be assessed using xylogenesis observations performed at a weekly resolution over the growing season (Lobzhanidze, 1961; Vaganov, Shashkin, 2000; Antonova, Stasova, 1997; Vieira et al., 2009; Cuny et al., 2015; Rathgeber et al., 2011). Such observations provide time-explicit ecophysiological information on the process of growth, linking physiological processes (photosynthesis, transpiration, accumulation and redistribution of carbohydrates, etc.) to structural and functional changes in xylem and enabling analysis of a wide range of factors influencing plant growth with high temporal resolution (Rinne et al., 2015; Steppe et al., 2015; Churakova et al., 2016; Fonti et al., 2018). These data are needed to understand current and to predict expected multi-parameter tree-growth responses to climate change.

To correctly interpret the environmental variability of growth responses to environmental changes, it is also important to investigate the effects of ontogenetic processes on tree-ring formation dynamics. For example, little is still known about the effect of age on the rate and duration of tree growth (different phases of xylem formation). The few previous studies reported that under equal environmental conditions, young trees have an earlier onset and a longer duration of each phase of xylogenesis compared to the old trees (Rossi et al., 2008). Therefore, young trees usually form a greater

number of cells during the growing period, are more sensitive to drought, and more easily form intra-annual density fluctuations (Rossi et al., 2008; Kishchenko, 2014; Campelo et al., 2015; Vieira et al., 2018; Popkova et al., 2018). The discrepancy in the timing of the different phases of xylem formation might cause variations in the climate signal recorded by different parameters of the tree ring such as the ring width, the cell anatomical structure, and the intra-annual wood density (Connor, Lanner, 1990; Vaganov, Shashkin, 2000).

The aim of this study was to estimate the differences in the timing and rate of intra-annual xylem formation in young (30 year-old) and old (95 year-old) Scots pine trees growing in the forest-steppe zone of Southern Siberia (Russia). By quantifying the timing of cambial activity, we also determined the onset and cessation of different phases of tracheid formation such as the division, enlargement, wall thickening, and maturation and estimated impact of these processes on the anatomical parameters of tracheids forming the tree rings. Two groups of trees of different ages were compared.

## Materials and Methods

The study area is located in the forest-steppe zone of Southern Siberia, close to the city of Minusinsk (53°39' N, 91°35' E, 319 m a.s.l.). The uneven-aged *Pinus sylvestris* L. stand is part of the pine forest band of the Minusinsk Depression (Fig. 1). The stand understory is composed of shrubs (*Caragana arborescens* Lam., *Cotoneaster melanocarpus* Fisch. ex Blytt., *Rosa acicularis*



Fig. 1. A photograph of the study stand

Lindl.) – 30%, and grasses (*Iris ruthenica* Ker.-Gawl., *Phleum phleoides* (L.) H. Karst., *Poa pratensis* L., *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz., *Thalictrum minus* L.) – 40-50%. The climate is continental with an annual air temperature of 1.2 °C and the total annual precipitation of 343 mm (data are retrieved from the Minusinsk Meteorological Station of the Russian Research Institute of Hydrometeorological Information for the period of 1936-2015 (<https://meteo.ru>)).

To monitor tree stem radial growth, wood cores 5-mm in diameter were collected perpendicular to the stem axis at breast height from 20 dominant and co-dominant pine trees with regular growth and equally distributed between two age groups. Annual tree-ring width (TRW) was measured on each core using a LINTAB measuring table combined with the TSAP program (Rinntech, Heidelberg, Germany) with 0.01 mm precision (Rinn, 1996). The time-series obtained were visually cross-dated, and dating quality was verified using the COFECHA program (Holmes, 2001). Five trees per age group

(30 and 95 year-old ones) were chosen for further xylogenesis observations.

Stem wood samples about 1 cm long (including two–three annual rings of the preceding growth years) were taken from the five young and five old trees weekly from the beginning of April to mid-September in 2014 using a Hagloff increment borer (Sweden). Samples were taken following a spiral pattern around the trunk at 5 cm apart starting at breast height. After collection, samples were immediately placed into cylindrical containers with a glycerin-alcohol-water fixing fluid (1:1:1). In total, seasonal wood samples were collected 20 times over the growing period.

From each sample, a 15 µm-thin microsection was cut with a Thermo Scientific Microm HM 450 sledge microtome. Sections were stained with 2% astra-blue and 1% safranin solution to enhance contrast between lignified and unlignified tissues. The sizes of different zones of rings and the number and size of cells were measured using an image analysis system (Carl Zeiss, Jena, Germany) and AxioVision

SE64 Rel. 4.9.1 software package, which made it possible to determine the parameters of cell structure in different parts of an annual ring in a semiautomatic mode. Three tracheid radial rows (from the internal towards the external tree-ring boundary) were measured for each annual ring and the values were then averaged.

The cells were assigned to the following developmental zones: (1) cambial zone; (2) cell extension zone; (3) zone of primary cell wall lignification; and (4) mature tracheid zone. The polarization filter was used to discriminate between the cell extension zone and the zone of primary cell wall lignification.

Tracheid anatomical parameters were measured in the last collected sample, which included all mature tracheids formed during the 2014 growing season. Five radial rows of cells with the largest cross-sectional area were selected. The radial lumen diameter (LD) and double cell-wall thickness (2CWT) were measured and then used to calculate the radial size of tracheids ( $D = LD + 2CWT$ ). According to Mork's index (Denne, 1989), the ratio between the width of the double cell wall and lumen diameter was used to assign the tracheids to early (EW,  $2CWT < LD$ ) and late wood (LW,  $2CWT > LD$ ) of each ring. Because of the different numbers of cells within the annual rings of the young and the old trees, cell number (cell-wall thickness and cell radial diameter) was standardized to a common number (15) to compare the same ring sectors between two groups (Vaganov, 1990; Babushkina et al., 2019). The significance of differences of anatomical parameters between the two groups was estimated using Student's *t*-test.

## Results

The cambial zone of the trees included five to seven cells during their dormant period (in spring and autumn) (Fig. 2A). The beginning of the cambial activity, as observed on the xylem side,

occurred simultaneously in both groups on April 11 (Day 101 of the year (DOY)). The duration of the cambial activity was 110 days, and there were 10 dividing cells within the zone, on average. The maximum activity was observed two weeks earlier for younger trees than for older trees (May 18 and June 2, respectively); the first cells were detected in the enlargement zone at the same time (Fig. 2B). At the end of July, the cambial activity stopped. Cell enlargement in younger trees ended two weeks earlier than in the older ones.

The emergence of cells in the cell-wall thickening and the primary lignification zones was observed on May 8 (DOY 128) for young trees and on May 16 (DOY 136) for old trees, reaching the maximum on August 7 and 28 for young and old trees, respectively. On the last sampling day (September 18), two young trees out of five did not finish cell-wall lignification, whereas all old trees had already completed xylem formation.

Mature tracheids with the fully formed secondary cell wall were observed in pine earlywood of both age groups simultaneously, at the beginning of June. The maximum number of cells (up to 60) was counted for trees of the old group. However, the percentage of the mature tracheids relative to the total cell number within the tree ring was higher for the young trees, reaching 80% as early as the beginning of August (Fig. 3).

The mean tree-ring width in the young and old trees for the period from 1985 to 2014 was 2.34 and 1.41 mm, respectively. Ring width dynamics in the young trees was similar to the ring width dynamics in the old trees when they were of the same age (Fig. 4A). The range of ring widths was also comparable between the groups at similar ages (Fig. 4B). Periods of 1962-1965 and 1975-1977 were characterized by dry conditions (Kostyakova et al., 2018), which significantly affected the old trees (Fig. 4A). The absence of fire scars suggests that the selected trees were not

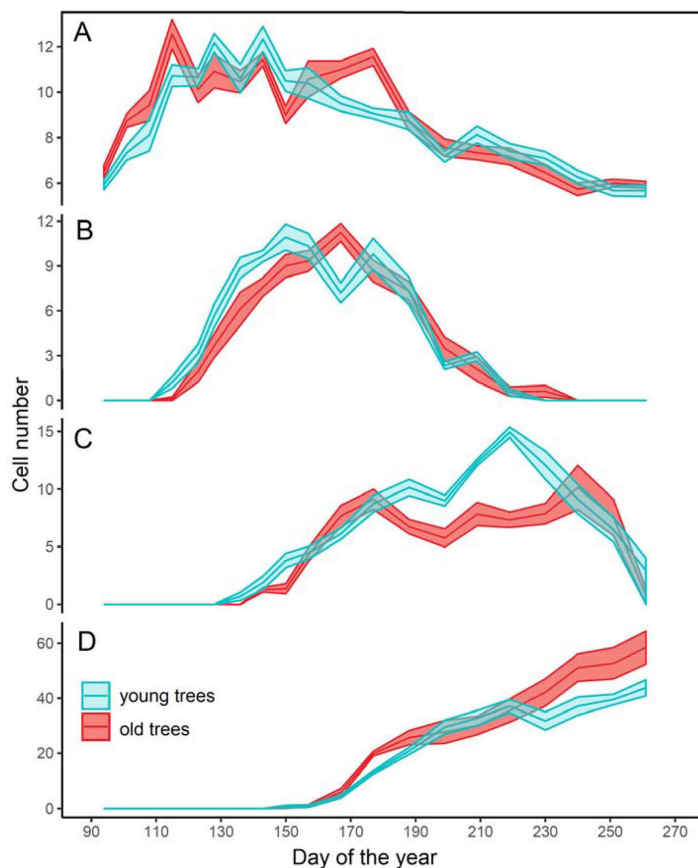


Fig. 2. Mean cell number ( $\pm$  standard error) of the different zones of the developing tree ring: *A* – cambial zone; *B* – zone of enlarging cells; *C* – cell-wall thickening zone; *D* – zone of the mature cells. Blue is young trees, red is old trees

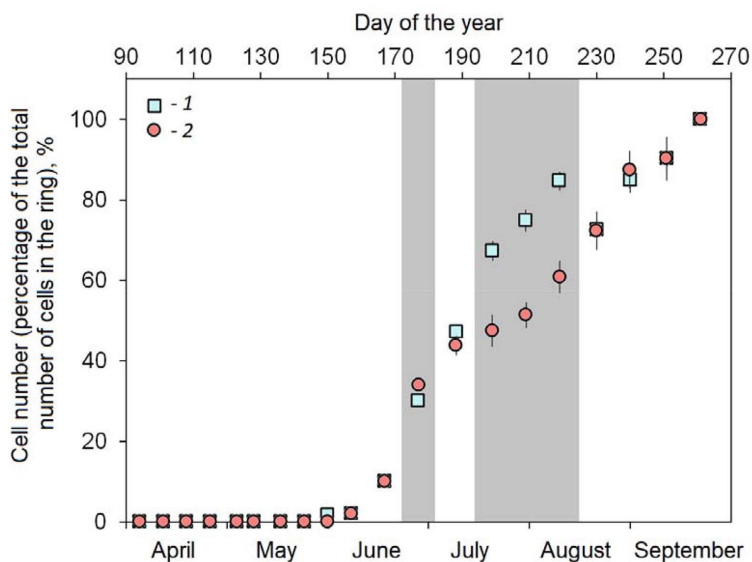


Fig. 3. Cell number dynamics ( $\pm$  standard error) within tree rings of 2014: 1 – young trees; 2 – old trees. Gray area shows statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the trees of two age classes

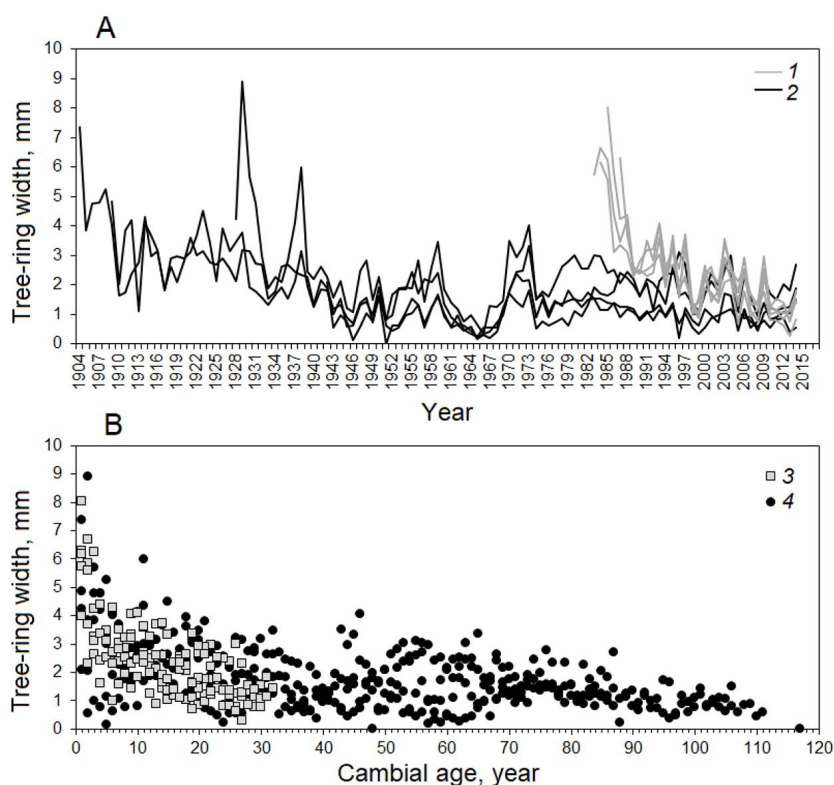


Fig. 4. *A* – individual tree-ring width chronologies of trees, *B* – tree radial growth relative to the cambial age. 1, 3 – young trees, 2, 4 – old trees

affected by forest fires, although fires often occur in the pine forests of the Minusinsk Depression in years with low amounts of precipitation in the spring following a low-snow winter.

In 2014, the tree-ring width in young and old trees was 1.52 and 1.76 mm ( $p = 0.399$ ), with the average cell number of 46 and 52, respectively. The intra-annual variability of the cell radial diameter in young and old trees showed similar patterns, with 45  $\mu\text{m}$  sized tracheids in the first part of the ring and a uniform decrease towards the ring boundary (Fig. 5A). The cell-wall thickness showed statistically significant differences between the groups, which are more clearly seen in the standardized tracheidograms (Fig 5B, C). Cell-wall thickness was higher in the young trees in the second part of earlywood and transition zones (positions 8-12 of the tracheidogram,

$p < 0.10$ ), with the maximum CWT reaching 6.2  $\mu\text{m}$  in the young trees compared with 5.5  $\mu\text{m}$  in the old trees. In addition, cell-wall thickening occurred when the difference between the integrated growth rates in the two age groups was the greatest (Fig. 3).

### Discussion

Based on the climate data, 2014 was one of the most favorable years in the last few decades for the study area (Tychkov et al., 2019). The Scots pine xylogenesis dynamics was consistent with the data previously reported for other conifer species in the boreal zone (Rossi et al., 2008; Bryukhanova et al., 2013). The maximum cell number in the enlargement zone matched the highest level of the cambial activity and corresponded to the longest sunshine duration



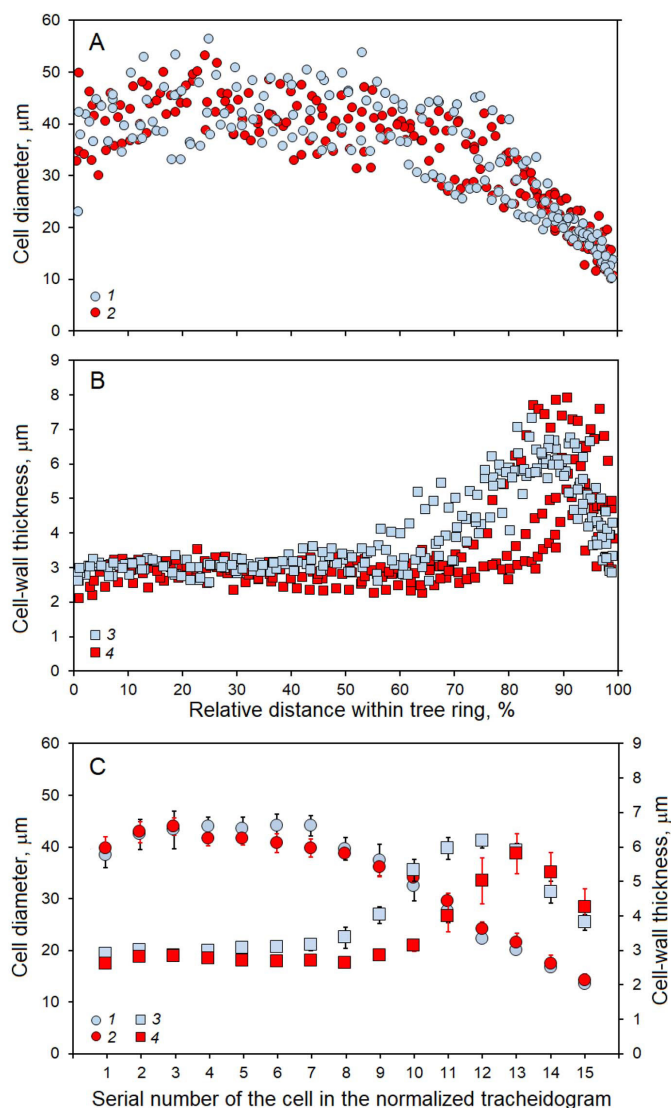


Fig. 5. Cell radial diameter (A) and cell-wall thickness (B) within pine tree rings formed in 2014 and (C) standardized tracheidogram of both anatomical parameters: 1, 3 – young trees; 2, 4 – old trees. Thin vertical lines indicate the standard error

and highest rate of photosynthesis and production of assimilates (Vaganov et al., 2006). The non-significant differences in the number of cells in the cambial zone between the young and the old trees resulted in the similar tree ring widths and numbers of tracheids produced. The delay of the cell enlargement and cell-wall thickening noted in the old trees was reflected in differences in the cell-wall thickness but not in the cell radial diameter. Based on the results obtained in this

study, the maximal cell number in the zones of wall thickening and mature cells was observed in August for the young trees and in September for the old trees. As it has been reported that cell-wall thickening can take place for up to 45-50 days in the old pine trees (Vaganov, Shashkin, 2000), the kinetics of cell-wall thickening could be assumed not only to start later, but also to have a lower rate. Detailed measurements and special experiments are needed to see whether this difference results

from a lack of assimilates for biosynthesis of the cell wall or from the competition for assimilates between tracheid differentiation processes (Carteni et al., 2018). However, the differences in the physiological processes (photosynthesis, transpiration, discrimination of carbon isotopes) and in the accumulation and redistribution of assimilates during the growing season, which affect the stem growth rate and productivity of both groups, may also be associated with their age (Meinzer et al., 2011). Indeed, as noted above, young trees grow at a fast rate, whereas mature and old trees may have more conservative growth strategy (Vieira et al., 2009). In addition, the direct influence of exogenous factors, such as solar radiation, on the growth of Scots pine and the anatomical structure of its annual rings can be modified by the canopy position of the tree (Kishchenko, 2015). As under natural (non-experimental) conditions, it is rather difficult to separate the influence of the tree size from the effect of its age on stem growth, this might be the next step of a complex xylogenesis study in even- and uneven-aged forests.

In addition, a thinner cell wall means less carbon accumulation in the stem of a woody plant. Consequently, faster seasonal growth of the young trees in the study area also implies accumulation of greater carbon mass per unit of wood volume. This may be another argument in favor of formation of young stands as potential

sink for atmospheric carbon dioxide (Zhou et al., 2015).

### Conclusion

The data obtained in this study could not confirm the definitive effect of tree age on the timing and duration of various phases of wood formation. Research addressing differences in the xylogenesis between the trees of different age groups should take into account the tree vigor and social status, the possible level of competition, and other factors that might limit tree growth. Long-term changes in annual radial growth of the trees of this species and the duration of the juvenile period also play an important role. Despite the similar duration of the growing season (160 days) of both young and old trees, the delay in some developmental phases of older trees compared to the younger ones suggests potential time shift in recording of the climatic signal by the numerous tree-ring parameters. This assumption may be confirmed in the future by the dendroclimatic analysis. The data on the onset and duration of the cambial activity, the dynamics of seasonal cell production, cell extension, and cell-wall thickening in young and old pine trees can be used in the future as input parameters for the VS-model (Vaganov, Shashkin, 2000). This will provide biologically supported values as benchmarks for simulated values of both the annual growth and xylem anatomical structure (tracheidogram).

### Acknowledgements / Благодарности

The reported study was funded by the RFBR, project number 17-04-00610-a.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект 17-04-00610-a.

### References / Список литературы

- Antonova G.F., Stasova V.V. (1997) Effect of environmental factors on wood formation in larch (*Larix sibirica* Ldb.) stems. *Trees – Structure and Function*, 11(8): 462–468
- Babushkina E.A., Belokopytova L.V., Zhirnova D.F., Vaganov E.A. (2019) Siberian spruce tree ring anatomy: imprint of development processes and their high-temporal environmental regulation. *Dendrochronologia*, 53: 114–124

Bryukhanova M.V., Kirdeyanov A.V., Prokushkin A.S., Silkin P.P. (2013) Specific features of xylogenesis in Dahurian larch, *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr., growing on permafrost soils in Middle Siberia. *Russian Journal of Ecology*, 44(5): 361–366

Campelo F., Vieira J., Battipaglia G., de Luis M., Nabais C., Freitas H., Cherubini P. (2015) Which matters most for the formation of intra-annual density fluctuations in *Pinus pinaster*: age or size? *Trees – Structure and Function*, 29(1): 237–245

Carteni F., Deslauriers A., Rossi S., Morin H., De Micco V., Mazzoleni S., Giannino F. (2018) The physiological mechanisms behind the earlywood-to-latewood transition: a process-based modelling approach. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1053

Churakova (Sidorova) O.V., Shashkin A.V., Siegwolf R.T.W., Spahni R., Launois T., Saurer M., Bryukhanova M.V., Benkova A.V., Kuptsova A.V., Peylin P., Vaganov E.A., Masson-Delmotte V., Roden J. (2016) Application of eco-physiological models to the climatic interpretation of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  measured in Siberian larch tree-rings. *Dendrochronologia*, 39: 51–59

Connor K.F., Lanner R.M. (1990) Effects of tree age on secondary xylem and phloem anatomy in stems of Great Basin bristlecone pine (*Pinus longaeva*). *American Journal of Botany*, 77(8): 1070–1077

Cuny H.E., Rathgeber C.B.K., Frank D., Fonti P., Mäkinen H., Prislan P., Rossi S., del Castillo E.M., Campelo F., Vavrcik H., Camarero J.J., Bryukhanova M.V., Jyske T., Gricar J., Gryc V., De Luis M., Vieira J., Cufar K., Kirdeyanov A.V., Oberhuber W., Trembl V., Huang J.-G., Li X., Swidrak I., Deslauriers A., Liang E., Nojd P., Gruber A., Nabais C., Morin H., Krause C., King G., Fournier M. (2015) Woody biomass production lags stem-girth increase by over one month in coniferous forests. *Nature Plants*, 1(11): 15160

Denne M.P. (1989) Definition of latewood according to Mork (1928). *IAWA Bulletin*, 10(1): 59–62

Fonti M.V., Vaganov E.A., Wirth C., Shashkin A.V., Astrakhantseva N.V., Schulze E.-D. (2018) Age-effect on intra-annual  $\delta^{13}\text{C}$ -variability within Scots pine tree-rings from Central Siberia. *Forests*, 9(6): 364

Holmes R.L. (2001) Dendrochronology Program Library, Version 2001. Laboratory of Tree-Ring Research, University of Arizona, Tucson, Arizona USA

Kishchenko I.T. (2014) Seasonal growth of differently aged *Picea abies* L. (Karst.) trees in Northern Karelia. *Bulletin of Higher Educational Institutions. Russian Forestry Journal* [Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Lesnoi zhurnal], 2: 46–51 (in Russian)

Kishchenko I.T. (2015) Anatomical structure of tree rings *Pinus sylvestris* L. of different age and the position within the forest canopy of taiga zone. *Conifers of the Boreal Zone* [Hvojnye boreal'noj zony], 33(5-6): 217–220 (in Russian)

Kostyakova T.V., Touchan R., Babushkina E.A., Belokopytova L.V. (2018) Precipitation reconstruction for the Khakassia region, Siberia, from tree rings. *Holocene*, 28(3): 377–385

Lobzhanidze E.D. (1961) *Cambium and tree ring formation*. Tbilisi, AS GSSR, 156 p. (in Russian)

Meinzer F.C., Lachenbruch B., Dawson T.E. (2011) *Size- and age-related changes in tree structure and function*. Dordrecht, The Netherlands, Springer, 514 p.

Popkova M.I., Vaganov E.A., Shishov V.V., Babushkina E.A., Rossi S., Fonti M.V., Fonti P. (2018) Modeled tracheidograms disclose drought influence on *Pinus sylvestris* tree-rings structure from Siberian forest-steppe. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1144

Rathgeber C.B.K., Rossi S., Bontemps J.D. (2011) Cambial activity related to tree size in a mature silver-fir plantation. *Annals of Botany*, 108(3): 429–438

Rinn F. (1996) *TSAP V 3.6 Reference manual: computer program for tree-rings analysis and presentation*. Heidelberg, Frank Rinn Distribution, 264 p.

Rinne K.T., Saurer M., Kirilyanov A.V., Loader N.J., Bryukhanova M.V., Werner R.A., Siegwolf R.T.W. (2015) The relationship between needle sugar carbon isotope ratios and tree rings of larch in Siberia. *Tree Physiology*, 35(11): 1192–1205

Rossi S., Deslauriers A., Anfodillo T., Carrer M. (2008) Age-dependent xylogenesis in timberline conifers. *New Phytologist*, 177(1): 199–208

Steppe K., Sterck F., Deslauriers A. (2015) Diel growth dynamics in tree stems: Linking anatomy and ecophysiology. *Trends in Plant Science*, 20(6): 335–343

Tychkov I.I., Sviderskaya I.V., Babushkina E.A., Popkova M.I., Vaganov E.A., Shishov V.V. (2019) How can the parameterization of a process-based model help us understand real tree-ring growth? *Trees – Structure and Function*, 33(2): 345–357

Vaganov E.A. (1990) The tracheidogram method in tree-ring analysis and its application. *Methods of dendrochronology. Applications in the environmental sciences*. Cook E.R., Kairiukstis L.A. (eds.) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 63–75

Vaganov E.A., Hughes M.K., Shashkin A.V. (2006) *Growth dynamics of conifer tree rings: images of past and future environments*. Springer, Berlin, Heidelberg, 358 p.

Vaganov E.A., Shashkin A.V. (2000) *Growth and structure of conifer tree rings*. Novosibirsk, Nauka, 232 p. (in Russian)

Vieira J., Campelo F., Nabais C. (2009) Age-dependent responses of tree-ring growth and intra-annual density fluctuations of *Pinus pinaster* to Mediterranean climate. *Trees – Structure and Function*, 23(2): 257–265

Vieira J., Carvalho A., Campelo F. (2018) Xylogenesis in the early life stages of maritime pine. *Forest Ecology and Management*, 424: 71–77

Zhou T., Shi P., Jia G., Dai Y., Zhao X., Shanguan W., Du L., Wu H., Luo Y. (2015) Age-dependent forest carbon sink: Estimation via inverse modeling. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 120(12): 2473–2492

DOI 10.17516/1997-1389-0321

УДК 577

## Synthesis of Polyhydroxyalkanoates from Oleic Acid by *Cupriavidus necator* B-10646

Natalia O. Zhila<sup>a,b\*</sup>, Galina S. Kalacheva<sup>a</sup>,  
Evgeniy G. Kiselev<sup>a,b</sup> and Tatiana G. Volova<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biophysics SB RAS  
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Siberian Federal University*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 14.11.2019, received in revised form 19.02.2020, accepted 24.03.2020, published online 22.05.2020

**Abstract.** Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers of hydroxy derived fatty acids synthesized by various organisms. These polymers can be effectively used as a biocompatible and biodegradable alternative to the chemically synthesized plastic. PHA cost, however, still limits the increase in PHA production. One of the ways to reduce PHA cost is to use inexpensive carbon sources such as fatty acids. The aim of this work was to study the effect of various concentrations of oleic acid (5-50 g/L) on the growth of the *Cupriavidus necator* B-10646 bacterium, polymer synthesis and properties. Cells were grown for 48 h in Schlegel mineral medium at 30°C and 200 rpm on an incubator shaker. The content and the composition of the polymer were determined by chromatography of fatty acid methyl esters using a chromatography-mass spectrometer. The molecular weight distribution of the polymer was determined using gel permeation chromatography. Thermal analysis was performed using a differential scanning calorimeter. The maximum yield of biomass (6.4-6.7 g/L) and the highest polymer content (64-71% of the weight of dry biomass) were obtained from 10-20 g/L of oleic acid after 48 hours of cultivation. In addition to 3-hydroxybutyrate, which is the dominant monomer (more than 98 mol.%), 3-hydroxyvalerate (0.7-1.7 mol.%) and 3-hydroxyhexanoate (0.1-0.4 mol.%) were identified in the polymer synthesized by the bacterium. As the concentration of oleic acid was increased, both the weight average and the number average molecular weights decreased (from 803 to 381 kDa and from 292 to 94 kDa, respectively) but polydispersity of the polymers increased (from 2.8 to 4.1). The results obtained in the present study provide the basis for the next stage of scaling up the process of PHA synthesis from oleic acid.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: nzhila@mail.ru

ORCID: 0000-0002-6256-0025 (Zhila N.); 0000-0003-4472-7087 (Kiselev E.); 0000-0001-9392-156X (Volova T.)

**Keywords:** *Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoates, oleic acid, molecular weight.

Citation: Zhila N.O., Kalacheva G.S., Kiselev E.G., Volova T.G. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from oleic acid by *Cupriavidus necator* B-10646. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(2), 208-217. DOI: 10.17516/1997-1389-0321

## **Синтез полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 при росте на олеиновой кислоте**

**Н.О. Жила<sup>а,б</sup>, Г.С. Калачева<sup>а</sup>,  
Е.Г. Киселев<sup>а,б</sup>, Т.Г. Волова<sup>а,б</sup>**

<sup>а</sup>*Институт биофизики СО РАН  
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»  
Российская Федерация, Красноярск*  
<sup>б</sup>*Сибирский федеральный университет  
Российская Федерация, Красноярск*

**Аннотация.** Полигидроксиалканоаты – полимеры гидроксипроизводных жирных кислот, синтезируемые различными микроорганизмами, могут эффективно использоваться в качестве биоразрушаемой и биосовместимой альтернативы пластику, полученному путем химического синтеза. Однако стоимость ПГА по-прежнему ограничивает их производство. Одним из подходов снижения стоимости ПГА является использование недорогих углеродных источников, например таких, как жирные кислоты. Целью данной работы было исследование влияния различных концентраций олеиновой кислоты (5-50 г/л) на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646, синтез полимера и его характеристики. Бактерии выращивали в течение 48 ч в минеральной среде Шлегеля в термостатируемом шейкере-инкубаторе при 30 °С и 200 об/мин. Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот на газовом хромато-масс-спектрометре, молекулярно-массовое распределение полимера – с использованием гельпроникающей хроматографии. Термический анализ проводили с помощью дифференциально-сканирующего калориметра. Максимальная концентрация биомассы (6,4-6,7 г/л) и содержание полимера (64-71 % от веса сухой биомассы) получены при концентрациях олеиновой кислоты в среде 10-20 г/л за 48 ч культивирования. В составе полимера, синтезируемого бактериями, помимо 3-гидроксипропаноата, являющегося доминирующим мономером (более 98 мол. %), идентифицированы включения 3-гидроксивалерата (0,7-1,7 мол. %) и 3-гидроксигексаноата (0,1-0,4 мол. %). Показано, что с увеличением концентрации олеиновой кислоты происходило снижение как средневесовой (с 803 до 381 кДа), так и среднечисловой (с 292 до 94 кДа) молекулярной массы на фоне увеличения полидисперсности (с 2,8 до 4,1). Полученные результаты служат основой для последующего этапа масштабирования технологии синтеза ПГА из олеиновой кислоты.

**Ключевые слова:** *Cupriavidus necator*, полигидроксиалканоаты, олеиновая кислота, молекулярная масса.

Цитирование: Жила, Н.О. Синтез полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 при росте на олеиновой кислоте / Н.О. Жила, Г.С. Калачева, Е.Г. Киселев, Т.Г. Волова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 208-217. DOI: 10.17516/1997-1389-0321

## Введение

Полигидроксиалканоаты (ПГА) считают хорошей заменой обычным пластиком. ПГА синтезируются микроорганизмами и могут разрушаться в аэробных условиях до воды и углекислого газа, до метана – в анаэробных условиях. Механические, химические и термические свойства ПГА могут регулироваться модифицированием состава и содержания мономеров. Однако широкому использованию ПГА препятствует их высокая цена по сравнению с химически синтезированными полимерами (Lee, Choi, 1998). С экономической точки зрения для коммерциализации продукции ПГА очень важно разработать новый процесс с низкой стоимостью и слабым загрязнением при выделении полимера из бактериальных клеток (Chen et al., 2001). Показано, что около 40 % от цены поли(3-гидроксибутирата) (П(ЗГБ)) приходится на используемый субстрат. Следовательно, для снижения высокой производственной стоимости П(ЗГБ) необходимо применение более дешевых углеродных субстратов (Kim, 2000). В этой связи растительные масла (пальмовое, соевое, подсолнечное и др.), а также жирные кислоты (олеиновая, пальмитиновая, стеариновая и др.) могут быть использованы как для повышения продуктивности и урожая полимера, так и в качестве дешевых источников углерода (Fukui, Doi, 1998; Kahar et al., 2004).  $\beta$ -окисление жирных кислот приводит к увеличению концентрации ацетил-СоА, который является основным метаболитом в клетке и для построения органических молекул (вклю-

чая ПГА), и для энергетических нужд синтеза через цикл трикарбоновых кислот. В настоящее время применение жирных кислот и липидов для микробного производства ценных продуктов набирает популярность, так как синтез веществ, подобных ПГА, более эффективен при использовании микроорганизмами таких субстратов из-за более высокого удельного молярного содержания в них углерода (Kahar et al., 2004; Riedel et al., 2012; Tsuge et al., 2013). Показано, что экономический коэффициент по ПГА при росте на глюкозе составлял всего лишь 0,32-0,48 г ПГА/г используемой глюкозы (Yamane, 1992), тогда как на соевом масле – от 0,72 до 0,76 г ПГА/г масла (Fukui, Doi, 1998; Kahar et al., 2004). Использование в качестве источника углерода для продукции ПГА олеиновой кислоты как одной из широко распространенных ЖК и частого компонента триацилглицеринов природных масел показано для *Aeromonas hydrophila* (Chen et al., 2001), *Ralstonia eutropha* (Marangoni et al., 2000; Grigull et al., 2008), *Bacillus cereus* (Masood et al., 2017).

Целью данной работы было исследование влияния различных концентраций олеиновой кислоты на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646, синтез полимера и его характеристики.

## Материалы и методы

В работе использовали штамм водородокисляющих бактерий *C. necator* B-10646, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Бак-

терии выращивали в течение 48 ч в жидкой солевой среде в стеклянных колбах объемом 1 л при коэффициенте заполнения 0,5 с использованием термостатируемого шейкер-инкубатора Innova® серии 44 (New Brunswick Scientific, США) при 30 °С и 200 об/мин. Для выращивания бактерий использовали среду Шлегеля (Schlegel et al., 1961):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  – 9,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,025;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1 (г/л). Микроэлементы вводили по прописи Хоаглана из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,288;  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,030;  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,08;  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,176;  $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,050;  $\text{NiCl}_2$  – 0,008 (г/л). В качестве углеродного субстрата взята олеиновая кислота (АО «ЭКОС-1», Россия; степень чистоты 98-99 %) в концентрациях 5-50 г/л.

Расчет экономического коэффициента по биомассе проводили по формуле

$$Y = (X - X_0) / (S_0 - S),$$

где  $X$  и  $X_0$  – концентрация биомассы в конце и в начале эксперимента соответственно;  $S$  и  $S_0$  – концентрация субстрата в культуре в конце и в начале эксперимента соответственно.

Расчет экономического коэффициента по полимеру проводили по формуле:

$$Y = (P - P_0) / (S_0 - S),$$

где  $P$  и  $P_0$  – концентрация полимера в конце и в начале эксперимента соответственно,  $S$  и  $S_0$  – концентрация субстрата в культуре в конце и в начале эксперимента соответственно.

Концентрацию биомассы бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптической плотности культуры на колориметре КФК-2МП (Россия) при длине

$\lambda = 440$  нм. Содержание олеиновой кислоты в среде определяли после экстракции ее гексаном на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A (США). Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A (США) (Volova et al., 2002). Условия хроматографии: газ-носитель – гелий, скорость 1,2 мл/мин; колонка капиллярная DB-35MS, длина 30 м, диаметр 0,25 мм; начальная температура 55 °С, подъем температуры до 310 °С со скоростью 10 °С/мин. Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием гель-проникающей хроматографии (хроматограф Agilent Technologies 1260 Infinity (США)) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую ( $M_w$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность ( $PД = M_w/M_n$ ). Подробное описание метода оценки молекулярно-массового распределения полимера приведено в работе (Volova et al., 2014). Термический анализ проводили с помощью дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (Mettler Toledo, Швейцария). Полимер массой  $4,0 \pm 0,2$  мг помещали в алюминиевые тигли и нагревали со скоростью 5 °С в минуту. Температуру плавления ( $T_{пл}$ ) и термической деградации ( $T_{дегр}$ ) определяли по экзотермическим пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE» (Mettler Toledo, Швейцария).

Эксперименты проведены в трех повторностях. Приведены среднеарифметические значения и их стандартные отклонения. Для оценки достоверности влияния различных концентраций олеиновой кислоты на концентрацию биомассы и содержание полимера



выполнен однофакторный дисперсионный анализ при уровне значимости  $\alpha=0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследовано влияние различных концентраций олеиновой кислоты (5-50 г/л) на рост бактерий и содержание полимера, его состав и молекулярный вес. Максимальная концентрация биомассы 6,4-6,7 г/л получена при концентрациях олеиновой кислоты в среде 10-20 г/л. Дальнейшее увеличение концентрации олеиновой кислоты привело к снижению показателей урожайности биомассы (рис. 1). Максимальное содержание полимера (64-71 % от веса сухой биомассы) также получено при невысоких концентрациях олеиновой кислоты (10-25 г/л) (рис. 2). Дисперсионный анализ показал, что влияние концентрации олеиновой кислоты на величину урожайности по биомассе и содержанию полимера статистически достоверно ( $n = 24$ ,  $F_{\text{биомасса}} = 531$ ,  $F_{\text{полимер}} = 507$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Низкое содержание биомассы (3,5 г/л) и полимера (48 % от веса сухой биомассы) при концентрации олеиновой

кислоты 5 г/л, по всей видимости, связано с полной утилизацией данного субстрата на более ранних стадиях культивирования, что подтверждается отсутствием олеиновой кислоты в культуральной среде в конце культивирования (табл. 1). Следует отметить, что практически вся кислота была утилизирована бактериями за 48 ч только при исходной концентрации олеиновой кислоты 5 и 10 г/л, тогда как при более высоких начальных концентрациях (25-50 г/л) в среде осталось много неиспользованной олеиновой кислоты.

При культивировании *C. necator* B-10646 на олеиновой кислоте экономический коэффициент по биомассе ( $Y$ ) составлял 0,64-0,72 г биомассы/г используемого субстрата (табл. 1), что практически в 2 раза выше, чем при культивировании на сахарах (Kahar et al., 2004; Riedel et al., 2012; Tsuge et al., 2013), и согласуется с ранее полученными результатами других авторов (Yamane, 1992; Akiyama et al., 2003).

Ранее показано, что исследуемый штамм *C. necator* B-10646 при росте на сахарах (фрук-

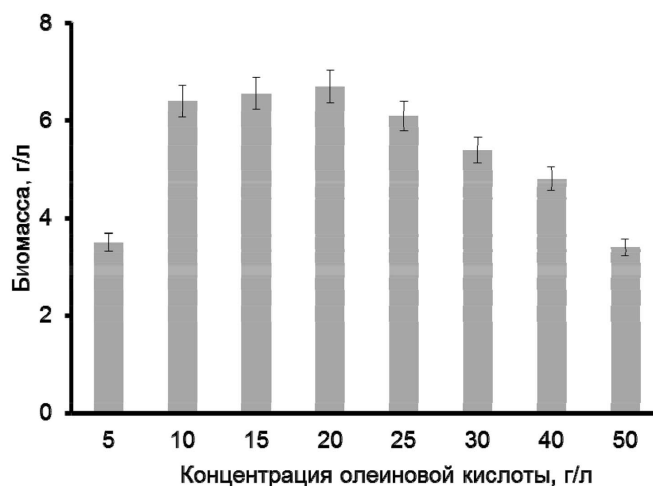


Рис. 1. Влияние концентрации олеиновой кислоты в среде на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646

Fig. 1. The effect of the concentration of oleic acid in the medium on the growth of bacterium *Cupriavidus necator* B-10646

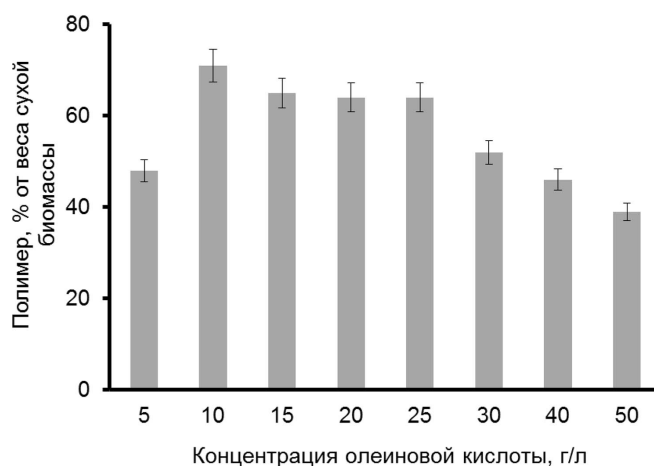


Рис. 2. Содержание полимера в клетках бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 в конце культивирования (48 ч) при различных концентрациях олеиновой кислоты в среде

Fig. 2. Polymer content in the cells of *Cupriavidus necator* B-10646 at the end of cultivation (48 h) at various concentrations of oleic acid in the medium

Таблица 1. Показатели культуры бактерий *Cupriavidus necator* B-10646, выращиваемых при различных концентрациях олеиновой кислоты в среде

Table 1. The culture parameters of *Cupriavidus necator* B-10646 grown at different concentrations of oleic acid in the medium

Концентрация олеиновой кислоты в среде в начале культивирования, г/л	Состав полимера, мол. %			M <sub>в</sub> , кДа	M <sub>ч</sub> , кДа	ПД	Содержание олеиновой кислоты в конце культивирования, г/л	Y, г биомассы/г субстрата	Y, г полимера/г субстрата
	ЗГБ	ЗГВ	ЗГГ						
5	98,5	1,2	0,3	803	292	2,8	—	0,70	0,34
10	98,7	0,9	0,4	642	222	2,9	0,6	0,68	0,48
15	98,9	1,0	0,2	617	217	2,8	5,9	0,72	0,47
20	98,8	1,0	0,2	604	199	3,0	10,1	0,68	0,43
25	99,1	0,7	0,2	595	190	3,1	15,5	0,64	0,41
30	98,9	1,1	-	485	109	4,4	22,3	0,70	0,36
40	98,6	1,3	0,1	423	104	4,1	33,3	0,72	0,33
50	98,0	1,7	0,3	381	94	4,1	45,2	0,71	0,28

Примечание: -- отсутствует.

тоза, глюкоза) синтезирует гомополимер поли(3-гидроксипутират) (Zhila et al., 2015). В составе полимера, синтезируемого бактериями при росте на олеиновой кислоте, помимо 3-гидроксипутирата, являющегося доминирующим мономером (более 98 мол. %), иден-

тифицированы включения 3-гидроксивалерата (0,7-1,7 мол. %) и 3-гидроксигексаноата (0,1-0,4 мол. %). Однако процентное содержание мономеров ЗГВ и ЗГГ практически не зависело от концентрации олеиновой кислоты в среде (табл. 1). Появление 3-гидроксивале-

рата и 3-гидроксигексаноата в составе полимера также наблюдали при культивировании *Alcaligenes* sp. NCIM No 5085 на олеиновой кислоте (Srivastava, Tripathi, 2013). Кроме того, изменение состава полимера у *Bacillus cereus* FA11 при замене углеводного субстрата на оливковое масло показано в работе (Masood et al., 2017).

Помимо общего выхода, исследованы состав и молекулярно-массовые характеристики ПГА, синтезируемых бактериями *C. necator* В-10646 (табл. 1). Показано, что с увеличением концентрации олеиновой кислоты происходило снижение как средневесовой, так и среднечисловой молекулярной массы на фоне увеличения полидисперсности. Известно, что молекулярная масса ПГА зависит от нескольких факторов: типа ПГА-синтазы, доступности мономеров для синтеза ПГА, присутствия ферментов, которые деполимеризуют ПГА, и уровня экспрессии ПГА синтазы (Rehm, 2003). Синтез ПГА с низкими значениями  $M_n$  происходит при высокой концентрации в клетках активной ПГА-синтазы и/или высокой экспрессии гена, кодирующего этот фермент (Sim et al., 1997). Наличие других мономеров в сополимере может также

приводить к значительному снижению его молекулярной массы. Снижение молекулярной массы полимера и возрастание его полидисперсности при увеличении концентрации олеиновой кислоты, как предположили Jurasek et al. (2004) и Tomizawa et al. (2010), были связаны со снижением скорости работы ПГА-синтазы и/или увеличением скорости реакции переноса цепи. Следует отметить, что полимер, синтезируемый на фруктозе исследуемым штаммом *C. necator* В-10646, характеризовался более высокой молекулярной массой (Volova et al., 2017). Снижение молекулярной массы полимера у *Aeromonas caviae* 505E/K/P при росте на соевом масле по сравнению с фруктозой показано в работе Tsuge et al. (2007). Более низкие значения молекулярной массы получены и для *Cupriavidus necator* Н16 при выращивании бактерий на пальмовом масле по сравнению с фруктозой (Arikawa et al., 2016).

ПГА, синтезируемые *C. necator* В-10646 при росте на олеиновой кислоте, характеризуются более низкой температурой плавления ( $T_{пл}$ ) по сравнению с полимером, полученным при использовании фруктозы в качестве источника углерода (табл. 2). Возможно, это

Таблица 2. Температурные характеристики полимеров, полученных при выращивании бактерий на олеиновой кислоте

Table 2. Temperature characteristics of polymers synthesized by bacterial cells grown on oleic acid

Концентрация олеиновой кислоты в среде, г/л	Состав полимера, мол. %			$T_{пл}$ , °C	$T_{дегр}$ , °C	Ссылка
	ЗГБ	ЗГВ	ЗГГ			
10	98,7	0,9	0,4	162	288	Это исследование
30	98,9	1,1	–	168	294	Это исследование
50	98,0	1,7	0,3	169	291	Это исследование
0	100	–	–	178	295	Volova et al., 2017
0	100	–	–	173	н.д.	Grigull et al., 2008
1,5	100	–	–	171	н.д.	Grigull et al., 2008
3,0	100	–	–	149, 162	н.д.	Grigull et al., 2008

Примечание: – – отсутствует, н.д. – нет данных.

связано с имеющимися в составе ПГА в небольших количествах мономерами ЗГВ и ЗГГ, наличие которых в полимере, как известно, сопровождается снижением  $T_{пл}$  (Murugan et al., 2017; Volova et al., 2013). Однако в работе Grigull et al. (2008) показано снижение  $T_{пл}$  гомополимера П(ЗГБ), синтезированного в присутствии олеиновой кислоты в концентрации 3 г/л, по сравнению с П(ЗГБ), полученным при более низких концентрациях олеиновой кислоты или при ее отсутствии в среде (табл. 2).

### Заключение

Исследован рост *C. necator* В-10646 и синтез полимера при выращивании бактерий на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода олеиновую кислоту в концентрациях 5-50 г/л. Максимальные величины урожайности по биомассе и содер-

жанию полимера получены при исходных концентрациях олеиновой кислоты 10-20 г/л и минимальных остаточных концентрациях субстрата (0,6-10,1 г/л). Установлено, что полимер, синтезируемый бактериями в присутствии олеиновой кислоты, не является гомополимером П(ЗГБ) – в его составе помимо основного мономера ЗГБ входят мономеры ЗГВ и ЗГГ, однако не установлена взаимосвязь между концентрацией олеиновой кислоты и содержанием мономеров ЗГВ и ЗГГ. С увеличением концентрации олеиновой кислоты происходило снижение средневесовой и среднечисловой молекулярной массы полимера. Таким образом, культивирование бактерий с целью получения полимера при использовании в качестве субстрата олеиновой кислоты лучше проводить при относительно низких ее концентрациях.

### Благодарности / Acknowledgements

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 17-44-240775 и гос. задания № FSRZ-2020-0006.

This study was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Krasnoyarsk Territory, the Krasnoyarsk Regional Fund for the Support of Scientific and Scientific-Technical Activities (Project No. 17-44-240775) and State Assignment № FSRZ-2020-0006.

### Список литературы / References

- Akiyama M., Tsuge T., Doi Y. (2003) Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, 80(1): 183-194
- Arikawa H., Sato S., Fujiki T., Matsumoto K. (2016) A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16. *Journal of Biotechnology*, 227: 94-102
- Chen Y.G., Yang H.Z., Zhou Q., Chen J., Gu G.W. (2001) Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*. *Process Biochemistry*, 36(6): 501-506
- Fukui T., Doi Y. (1998) Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(3): 333-336

Grigull V.H., da Silva D.D., Garcia M.C.F., Furlan S.A., Pezzin A.P.T., Schneider A.L.S., Aragão G.F. (2008) Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) from oleic acid by *Ralstonia eutropha*. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2): 223-228

Jurasek L., Marchessault R.H. (2004) Polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* cells: a computer simulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5): 611-617

Kahar P., Tsuge T., Taguchi K., Doi Y. (2004) High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*, 83(1): 79-86

Kim B.S. (2000) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10): 774-777

Lee S.Y., Choi J.I. (1998) Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3): 387-393

Marangoni C., Furigo A.Jr., de Aragão G.M.F. (2000) Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnology Letters*, 22(20): 1635-1638

Masood F., Abdul-Salam M., Yasin T., Hameed A. (2017) Effect of glucose and olive oil as potential carbon sources on production of PHAs copolymer and tercopolymer by *Bacillus cereus* FA11. *3 Biotech*, 7: 87

Murugan P., Gan C.-Y., Sudesh K. (2017) Biosynthesis of P(3HB-co-3HHx) with improved molecular weights from a mixture of palm olein and fructose by *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 1112-1119

Rehm B.H.A. (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1): 15-33

Riedel S.L., Bader J., Brigham C.J., Budde C.F., Yusof Z.A.M., Rha C., Sinskey A.J. (2012) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(1): 74-83

Schlegel H.G., Kaltwasser H., Gottschalk G. (1961) A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. *Archiv für Mikrobiologie*, 38: 209-222 (in German)

Sim S.J., Snell K.D., Hogan S.A., Stubbe J., Rha C.K., Sinskey A.J. (1997) PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 15(1): 63-67

Srivastava S.K., Tripathi A.D. (2013) Effect of saturated and unsaturated fatty acid supplementation on bio-plastic production under submerged fermentation. *3Biotech*, 3(5): 389-397

Tomizawa S., Saito Y., Hyakutake M., Nakamura Y., Abe H., Tsuge T. (2010) Chain transfer reaction catalyzed by various polyhydroxyalkanoate synthases with poly(ethylene glycol) as an exogenous chain transfer agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4): 1427-1435

Tsuge T., Watanabe S., Sato S., Hiraishi T., Abe H., Doi Y., Taguchi S. (2007) Variation in copolymer composition and molecular weight of polyhydroxyalkanoate generated by saturation mutagenesis of *Aeromonas caviae* PHA synthase. *Macromolecular Bioscience*, 7(6): 846-854

Tsuge T., Ko T., Tago M., Abe H. (2013) Effect of glycerol and its analogs on polyhydroxyalkanoate biosynthesis by recombinant *Ralstonia eutropha*: a quantitative structure-activity relationship study of chain transfer agents. *Polymer Degradation and Stability*, 98(9): 1586-1590

Volova T.G., Kalacheva G.S., Altukhova O.V. (2002) Autotrophic synthesis of polyhydroxyalkanoates by the bacteria *Ralstonia eutropha* in the presence of carbon monoxide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5): 675-678

Volova T.G., Zhila N.O., Shishatskaya E.I., Mironov P.V., Vasil'ev A.D., Sukovatyi A.G., Sinskey A.J. (2013) The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures. *Polymer Science, Series A*, 55(7): 427-437

Volova T., Kiselev E., Vinogradova O., Nikolaeva E., Chistyakov A., Sukovatyi A., Shishatskaya E. (2014) A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. *PLoS One*, 9(2): e87551

Volova T.G., Vinogradova O.N., Zhila N.O., Kiselev E.G., Peterson I.V., Vasil'ev A.D., Sykovatyi A.G., Shishatskaya E.I. (2017) Physicochemical properties of multicomponent polyhydroxyalkanoates: novel aspects. *Polymer Science, Series A*, 59(1): 98-106

Yamane T. (1992) Cultivation engineering of microbial bioplastics production. *FEMS Microbiology Reviews*, 103(2-4): 257-264

Zhila N., Kalacheva G., Volova T. (2015) Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown on different carbon sources. *Process Biochemistry*, 50(10): 69-78

DOI 10.17516/1997-1389-0324

УДК 573.6.086.83:577.21

## Development of the Method to Produce Functionally Active Recombinant Streptavidin in *Escherichia coli* Cells

Eugenia E. Bashmakova\*,  
Alexander N. Kudryavtsev and Ludmila A. Frank  
*Institute of Biophysics SB RAS  
FRC «Krasnoyarsk Science Center SB RAS»  
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 30.12.2019, received in revised form 25.03.2020, accepted 23.04.2020

**Abstract.** Streptavidin is a homotetrameric protein produced by *Streptomyces avidinii*, each subunit of which binds biotin (vitamin H), forming a stable complex ( $K_d = 10^{-15}$  M). Streptavidin-biotin coreaction is widely used in analytical systems, for targeted delivery of compounds, for affinity purification, etc. The aim of this study was to develop a rational technique to produce functionally active recombinant streptavidin. Recombinant *Escherichia coli* strains producing minimal core and full-sized streptavidin variants were obtained. The *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) RIPL, as host cells, and the pET19b plasmid carrying gene of minimally-sized core (miniSAV) or full-sized (SAV) streptavidin were used. Synthesis of miniSAV results in its localization as insoluble inclusion bodies. Denatured miniSAV yield was 130 mg per liter of *E. coli* culture. The renaturation gives only 10-15 % of the functionally active protein. Full-sized streptavidin localizes in the cytoplasm in a soluble state, but its toxicity causes low yield of the protein (10-13 mg per liter of the culture). The induction of SAV synthesis at the end of the logarithmic stage of cell growth was found to increase the yield of SAV approximately 2-fold. The yield of functionally active protein was 30 mg per liter culture. SAV was produced practically in individual state after affine chromatography on 2-iminobiotin agarose. One molecule of full-sized streptavidin bound 3.9 biotin molecules as was shown by colorimetric analysis using HABA (4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid). Both streptavidins form sandwich-type complexes with biotinylated molecules in solid-phase microassay conditions. *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) RIPL/pET19bSAV strain was stable during storage with 20 % glycerol at -70 °C, which was shown by repeated two-year reseeded. The streptavidin producing strain (*E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) RIPL/pET19bSAV) is deposited in the Collection for extremophile microorganisms and type

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: bashmakovae@ibp.ru

ORCID: 0000-0002-8951-8599 (Bashmakova E.); 0000-0003-0034-1879 (Kudryavtsev A.); 0000-0003-4462-1944 (Frank L.)

cultures (Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk), No. 3505. The method for producing functionally active recombinant streptavidin developed in this study ensures its availability for biotechnological research.

**Keywords:** recombinant streptavidin, *E. coli* protein-producing strain, microanalysis.

---

Citation: Bashmakova E.E., Kudryavtsev A.N., Frank L.A. Development of the method to produce functionally active recombinant streptavidin in *Escherichia coli* cells. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(2), 218-229. DOI: 10.17516/1997-1389-0324

---

## **Разработка способа получения функционально активного рекомбинантного стрептавидина в клетках *Escherichia coli***

**Е.Е. Башмакова, А.Н. Кудрявцев, Л.А. Франк**  
*Институт биофизики СО РАН*  
*ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»*  
*Российская Федерация, Красноярск*

---

**Аннотация.** Стрептавидин – гомотетрамерный белок, продуцируемый *Streptomyces avidinii*, каждая субъединица которого связывает биотин (витамин Н) с образованием стабильного комплекса ( $K_d = 10^{-15}$  М). Стрептавидин-биотиновое взаимодействие используют в аналитических системах, для адресной доставки соединений, для аффинной очистки веществ и т.д. Цель данного исследования – разработать рациональный способ получения рекомбинантного функционально активного стрептавидина. Сконструированы штаммы *Escherichia coli* – продуценты минимального корового и полноразмерного вариантов стрептавидина с использованием одной и той же экспрессирующей системы – *E. coli* BL21 Codon plus (DE3) RIPL в качестве клеточных хозяев и плазмиды pET19b, несущей ген минимального (miniSAV) или полноразмерного (SAV) стрептавидина. Экспрессия miniSAV сопровождается его локализацией в *E. coli* в виде нерастворимых телец включения. С 1 л культуры было получено 130 мг высокоочищенного денатурированного белка. Выход функционально активного белка после рефолдинга составил 10-15 %. Полноразмерный стрептавидин синтезируется в растворе цитоплазмы, но его токсичность обуславливает низкий выход (10-13 мг с 1 л культуры) этого белка при стандартных условиях культивирования. Установлено, что индукция синтеза SAV в конце логарифмической фазы роста культуры обеспечивает выход функционально активного белка 30 мг с 1 л культуры. Препарат высокоочищенного SAV получали одностадийной аффинной хроматографией на 2-иминобиотин-агарозе. Колориметрическим анализом с использованием красителя НАВА (4-гидроксиазобензол-2-карбоновой кислоты) определено, что одна молекула SAV связывает 3,9 молекулы биотина. Штамм *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) RIPL/pET19bSAV стабилен при хранении с добавлением



20 % глицерина при минус 70 °С, что подтверждено многократными посевами в течение 2 лет. Показана применимость обоих вариантов стрептавидина для образования высокоспецифичных комплексов между биотинилированными молекулами в условиях твердофазного микроанализа сэндвич-типа. Штамм-продуцент рекомбинантного стрептавидина (*E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) RIPL/pET19bSAV) хранится в коллекции экстремофильных и типовых культур ИХБФМ СО РАН (Новосибирск), № КЭМТК 3505. Разработанный способ получения рекомбинантного функционально активного стрептавидина обеспечивает его доступность для биотехнологических исследований.

**Ключевые слова:** рекомбинантный стрептавидин, штамм-продуцент *E. coli*, микроанализ.

Цитирование: Башмакова, Е.Е. Разработка способа получения функционально активного рекомбинантного стрептавидина в клетках *Escherichia coli* / Е.Е. Башмакова, А.Н. Кудрявцев, Л.А. Франк // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 218-229. DOI: 10.17516/1997-1389-0324

## Введение

Стрептавидин – это гомотетрамерный белок, продуцируемый *Streptomyces avidinii*, каждая субъединица которого связывает биотин (витамин Н). Образующийся при этом комплекс обладает уникальной для нековалентных соединений стабильностью ( $K_d = 10^{-15}$  М). Благодаря этому стрептавидин-биотиновое взаимодействие широко используют в различных аналитических системах, для адресной доставки соединений, для аффинной очистки целевых соединений и т.д. (см., напр., обзор Dundas et al., 2013). Стрептавидин всесторонне изучен: определены его физико-химические свойства, пространственная структура интактного белка и его многочисленных генетических вариантов, а также комплексов с биотином. Коммерчески доступен сам белок и множество его производных – химических конъюгатов и генетических гибридов с другими белками, а также биотин и его производные. Уникальные свойства этой системы вызывают постоянный интерес, в большей степени прикладной, и публикации о получении новых вариантов стрептавидина, разработке новых продуцентов и способов выделения

этих белков появляются регулярно. В литературе с 1990-х гг. описаны бактериальные продуценты, в которых накопление стрептавидина происходит в виде нерастворимых телец включения (см., напр., Sano & Cantor, 1990; Humbert et al., 2005; Jouybari et al., 2018; Chua et al., 2018). Этот подход обеспечивает получение большого количества денатурированного белка, однако осложняется необходимостью проведения рефолдинга, который происходит с низким выходом функционально активного белка. Предложены варианты получения рекомбинантного стрептавидина с транслокацией в периплазматическое пространство клеток (Veiko et al., 1999) или в ростовую среду (Noda et al., 2015). Для выделения целевого белка в этих случаях необходимы дополнительные стадии либо фракционирования клеточной биомассы, либо его осаждения из ростовой среды с последующей денатурацией.

В некоторых работах стрептавидин получают в виде гибридного белка со вспомогательными пептидами, обеспечивающими его растворимость в цитоплазме, а также одностадийную аффинную очистку (Schmidt & Skerra, 1994; Gallizia et al., 1998; Sørensen

et al., 2003; Humbert et al., 2008; Noda et al., 2015). Анализ литературных данных по получению рекомбинантного стрептавидина выявляет довольно пеструю картину, когда авторы получают разные варианты стрептавидина с помощью разных экспрессирующих конструкций, используют различные условия денатурации-рефолдинга целевого белка, иногда указывают на возникающие противоречия с ранее опубликованными исследованиями и т.д. Все это не позволяет выбрать среди известных способов получения этого белка наиболее оптимальный.

Целью нашего исследования было разработать рациональный способ получения рекомбинантного функционально активного стрептавидина, для чего получить рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, обеспечивающий синтез белка с хорошей продуктивностью и простой способ его выделения и очистки. В ходе работ были рассмотрены способы получения двух вариантов стрептавидина – минимального корового и полноразмерного, отличающихся по размеру, но при этом, по литературным данным, обладающих близкой функциональной активностью.

## Материалы и методы

### Материалы

Высокоочищенный  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемый фотопротейн обелин получали так, как описано ранее (Ilarionov et al., 2000). Биотинилированные производные бычьего сывороточного альбумина (BSA-bio) и обелина (bio-Obe) получали реакцией с 20- и 5-молярным избытком сукцинимидного производного биотина (Pierce, США) с последующим удалением избытка реагента гель-фильтрацией (Frank, Vysotski, 1997). Олигонуклеотиды синтезированы ООО Биосан (Россия). В работе использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), d-биотин,

4-гидроксиазобензол-2-карбоновую кислоту (НАВА) (Pierce, США). Все вспомогательные реагенты отечественного производства (соли, кислоты, щелочи) были аналитической или химической чистоты.

Белковый состав образцов анализировали с помощью вертикального гель-электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (Laemmli, 1970). Анализ гелей проводили в камере AlphaImager (AlphaInnotech, США).

Концентрацию стрептавидина определяли колориметрически по методу, описанному в (Green, 1970), либо спектрофотометрически на длине волны 280 нм, пользуясь значением коэффициента экстинкции  $E^{0,1\%} = 3,4$  (Schmidt & Skerra, 1994).

### Конструирование плазмидных ДНК

#### *pET19b-SAV* и *pET19b-miniSAV*

с последовательностями,

кодирующими полноразмерный (А)

или минимальный коровый (Б)

стрептавидины соответственно

(А) Штамм *Streptomyces avidinii* (AC865, Российская национальная коллекция промышленных микроорганизмов) высевали в жидкую среду (10 г/л пептона, 5 г/л NaCl, pH=7,2) и культивировали 3 суток при 28 °С. Клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 4 °С). Хромосомную ДНК *S. avidinii* выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) и использовали в качестве матрицы для ПЦР.

Фрагмент ДНК, кодирующий полноразмерный стрептавидин без лидерного пептида (480 п.о.) с сайтами рестрикции 5'-(NcoI) и 3'-(XhoI), получали с помощью ПЦР с использованием Pfu-полимеразы (СибЭнзим, Россия) и следующих праймеров:

Up 5'-CGCT**CCATGG**ACCCCTCCAAGG  
ACTC-3';

Дп 5'-CGGGCTCGAGCTACTGCTGAA CGGCG-3'. Синтезированный фрагмент клонировали в вектор pET-19b (Novagen) по соответствующим сайтам с получением плазмиды pET19b-SAV.

(Б) В качестве матрицы для получения гена минимального стрептавидина использовали плазмиду pETSAV (Bashmakova et al., 2017). Фрагмент ДНК, кодирующий минимальный стрептавидин (376 п.о.) с сайтами рестрикции 5'-(NcoI) и 3'-(XhoI), получали с помощью ПЦР с использованием Pfu-полимеразы и следующих праймеров:

Ур 5'-CGCTCCATGGGCATCACCGGC ACCTGGTAC-3';

Дп 5'-CGGGCTCGAGTCACACCTTG GTGAAGGTGTCGTGG-3'. Синтезированный фрагмент клонировали в вектор pET-19b (Novagen) по соответствующим сайтам с получением плазмиды pET19b-miniSAV.

Последовательность клонированных фрагментов подтверждена секвенированием (ЦКП «Геномика» СО РАН, Россия).

#### *Биосинтез стрептавидина клетками E. coli*

Клетки *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) RIPL, далее – RIPL (Novagen), трансформированные pET19b-SAV, культивировали в LB-среде, содержащей ампициллин (200 мг/л), с активным перемешиванием (220 об/мин, Excella E25R Shaker, Eppendorf, Германия) при 37 °С. Синтез целевого белка инициировали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозида (ИПТГ) при определенном значении оптической плотности культуры (OD<sub>600</sub>) и продолжали культивирование в тех же условиях еще 4 ч. За накоплением стрептавидина следили с помощью электрофореза, анализируя белковый состав клеток в периодически отбираемых пробах.

Рекомбинантные клетки RIPL/pET19b-miniSAV культивировали в аналогичных условиях; индукцию синтеза минимального корового стрептавидина проводили при значении OD<sub>600</sub> культуры, равном 0,8. Далее культивировали в тех же условиях еще 4 ч.

#### *Выделение и очистка полноразмерного стрептавидина (SAV)*

Клетки *E. coli* осаждали центрифугированием (4000 g, 15 мин, 4 °С). Осадок ресуспендировали в буфере А (0,5 М NaCl, 50 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,0) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора при охлаждении льдом. Полученную суспензию центрифугировали (10000 g, 10 мин, 4 °С), осадок отбрасывали. Супернатант наносили на колонку, содержащую 2-иминобиотин агарозу (Pierce, США), уравновешенную буфером А, промывали пятикратным объемом того же буфера, а затем двукратным объемом буфера Б (1 М NaCl в 0,1 М К-Na-фосфатном буфере, pH 7,0 – ФБ). Элюцию стрептавидина проводили раствором 50 мМ CH<sub>3</sub>COOH, pH 4,0, элюат немедленно нейтрализовали добавлением 1 М Трис-НСl, pH 7,5. Фракции, содержащие стрептавидин, объединяли, переводили диализом в 5 мМ Трис-НСl, pH 7,5, лиофилизировали и хранили при минус 20 °С.

#### *Выделение и очистка рекомбинантного минимального корового стрептавидина (miniSAV)*

Клетки осаждали и дезинтегрировали, как описано выше. После центрифугирования супернатант отбрасывали, а осадок растворяли в 20 мМ Трис-НСl pH 7,0, содержащим 6 М мочевины, и наносили на колонку DEAE Sepharose FF (GE-Healthcare, США), уравновешенную тем же раствором. Белки элюировали градиентом NaOAc (0–0,5 М) в том же буфере. Фракции, содержащие целевой белок,

объединяли. Аликвоты, содержащие очищенный минимальный стрептавидин, диализовали против: а) 10 мМ Трис-НСl pH 7,0; б) 20 мМ К-Na-фосфатного буфера, pH 8,0; в) 0,2 М NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,8. Выпавший во всех случаях осадок, содержащий до 90 % miniSAV, отделяли центрифугированием, супернатант использовали для дальнейшей работы. Повторным растворением осадка и диализом получали еще около 10 % активного miniSAV.

#### Модельный твердофазный микроанализ

В лунки непрозрачного планшета (Costar, США) вносили по 100 мкл раствора BSA-bio (100; 33,3; 11,1; 3,7; 1,2; 0,41; 0,14; 0 нг/мл, ФБ) и инкубировали 12 ч при 8 °С. После промывки (ФБ, 0,1 % Tween 20, 5 мМ ЭДТА) в лунки вносили по 110 мкл 1%-го раствора бычьего сывороточного альбумина в ФБ, инкубировали 1 ч при 37 °С, затем промывали. Далее в лунки вносили по 100 мкл раствора полученных образцов стрептавидаина (ФБ, 1 мкг/мл), инкубировали со встряхиванием (350 об/мин, Thermomixer C, Eppendorf, Германия) в течение 1 ч при 37 °С, затем промывали и вносили по 100 мкл раствора bio-Obe (0,2 мкг/мл в 20 мМ Трис-НСl, pH 7,0, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЭДТА). После инкубирования со встряхиванием в течение 1 ч при 23 °С и промывки измеряли интегральный биолюминесцентный сигнал связавшегося обелина с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 (Berthold, Германия) сразу после впрыска 100 мкл раствора CaCl<sub>2</sub> (0,1 М в 0,1 М Трис-НСl, pH 8,8) в течение 3 с. Усредненный сигнал от контрольных лунок (с ФБ) вычитали от сигналов рабочих лунок.

#### Результаты и обсуждение

Современный рынок предлагает препараты стрептавидаина, его аналогов и конъюгатов с другими молекулами, в подавляющем

большинстве импортного производства, стоимость которых достаточно высока. Стрептавидин-биотиновая система благодаря своим уникальным свойствам нашла широкое применение как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. В этом аспекте важным является наличие доступного отечественного препарата этого белка. Природный стрептавидин *S. avidinii* в результате посттрансляционного процессинга может находиться в различных укороченных вариантах, каждый из которых обладает биоспецифической активностью (Bayer et al., 1989). Аминокислотная последовательность нативного стрептавидаина (183 а.о., рис. 1) включает лидерный пептид (24 а.о.), обеспечивающий секрецию белка, и полноразмерный стрептавидин (159 а.о., pdb ID: 1STP). Укороченный в результате протеолиза стрептавидин A13-S139 (127 а.о.) называется нативным коровым, иногда «зрелым». Показано, что коровый стрептавидин более стабилен, и, вероятно, многие коммерческие препараты этого белка являются продуктами частичного протеолиза полноразмерного стрептавидаина.

Минимальный коровый вариант стрептавидаина (G16-V133, 119 а.о.), состоящий только из аминокислот β-цилиндра, был получен Т. Sano с соавторами (Sano et al., 1995). Ими показано, что полное удаление концевых аминокислотных остатков приводит к повышению структурной стабильности белка и его способности к связыванию биотинсодержащих молекул.

На первом этапе нами получен штамм *E. coli* – продуцент минимального корового стрептавидаина (miniSAV) как наиболее стабильного варианта функционального стрептавидаина минимального размера (Sano et al., 1995). Рекомбинантные клетки, трансформированные плазмидой pET19b-miniSAV, культивировали до плотности OD<sub>600</sub>=0,8 и иници-

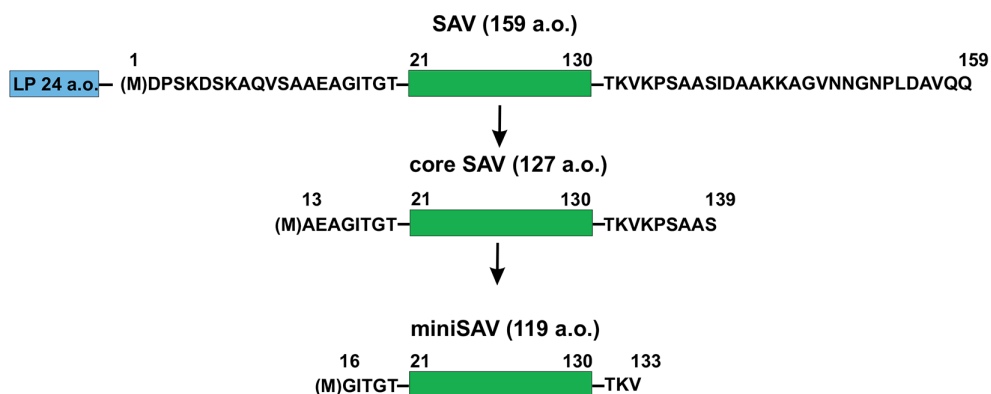


Рис. 1. Аминокислотная последовательность нативного стрептавидина: лидерный пептид (24 а.о., выделен синим), полноразмерный белок (SAV, 1–159), нативный коровый фрагмент (coreSAV, 13–139 а.о.), минимальный коровый фрагмент (miniSAV, 16–133 а.о.). Зеленым выделен константный участок белка. В скобках показаны метионины, введенные при конструировании плазмид pET19b-SAV, и pET19b-miniSAV. а.о. – аминокислотные остатки

Fig. 1. Amino acid sequence of native streptavidin: leader peptide (24 a.a., highlighted in blue), full-sized protein (SAV, 1–159), core streptavidin (coreSAV, 13–139 a.a.), minimal core fragment (miniSAV, 16–133 a.a.). Constant protein fragment is highlighted in green. Methionines introduced during construction of pET19b-SAV and pET19b-miniSAV plasmids are given in parentheses. a.o. – amino acid residues

ировали синтез стрептавидина добавлением ИПТГ. За ходом накопления стрептавидина и его распределением в клетках следили с помощью гель-электрофореза (рис. 2a). Через 1 ч после индукции появляется полоса нового белка с мол. массой около 13 кДа, близкой к расчетному значению массы мономера miniSAV. Вклад этой полосы через 1, 2,5 и 4 ч составил 9, 14 и 25 % соответственно. Практически весь белок был аккумулялирован в тельцах включения (рис. 2a), из которых его перевели в буфер, содержащий 6M мочевины, и очистили хроматографически. Выход полученного денатурированного miniSAV высокой степени очистки (99 %) составил 130 мг/л культуры. Функционально активный белок получали с помощью диализа против буферных растворов различного состава (см. экспериментальную часть). При этом во всех экспериментах 85–90 % белка вновь выпадали в осадок, который отделяли центрифугированием, белок в супернатанте использовали для работы далее. Способность miniSAV об-

разовывать специфичный комплекс сэндвич-типа с биотинилированными молекулами, стабильный в условиях твердофазного микроанализа, исследовали в модельном эксперименте (см. схему на рис. 3, сверху).

В качестве репортера использовали  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый фотопротеин обелин, молекула которого представляет собой фермент-субстратный комплекс апобелка и предокисленного субстрата – пероксицелентеразина (Frank, 2010). Присоединение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает яркую вспышку голубого света, интенсивность которого при насыщающей концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  прямо пропорциональна содержанию фотопротеина. Обелин и другие фотопротеины широко используются в качестве удобного высокочувствительного инструмента в различных аналитических системах (Frank, 2015). На поверхности непрозрачного планшета последовательным инкубированием растворов белков получали комплексы между биотинилированным производным бычьего сывороточного альбумина

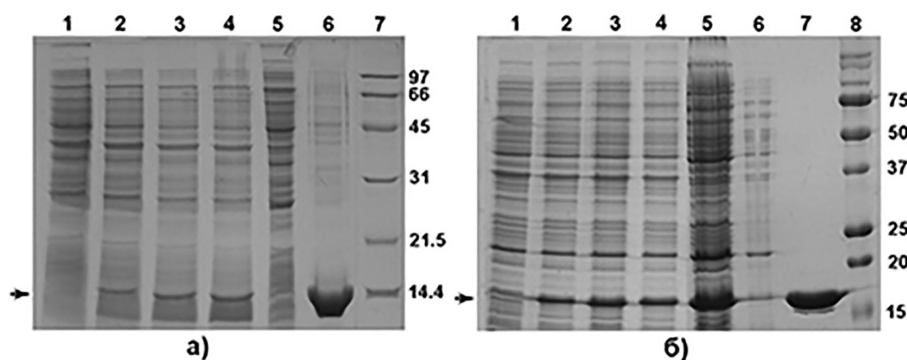


Рис. 2. (а) Электрофоретический анализ образцов при выделении miniSAV: 1 – тотальные белки клеток RIPL/pET19b-miniSAV до индукции; 2-4 – тотальные клеточные белки через 1, 3, 5 ч после индукции, образцы нормированы по плотности культуры; 5 – цитоплазматические белки; 6 – осадок телец включения (раствор в 6 М мочеvine); 7 – маркерные белки (BioRad, SDS-Page standards Low Range); (б) анализ образцов при выделении SAV: 1-6, то же, что и в случае (а); 7 – полноразмерный стрептавидин после хроматографической очистки; 8 – маркерные белки (BioRad, Precision Plus Protein Dual Xtra Standards). Молекулярная масса стандартных белков в кДа показана числами справа. Электрофорез проводили в 15%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, окрашивание Coomassie blue. Стрелками показаны полосы стрептавидинов

Fig. 2. (a) SDS-PAGE analysis of samples during minimal core streptavidin production: 1 – whole cell lysates before IPTG induction; 2-4 whole cell lysates 1, 3, and 5 h after induction, respectively, samples are normalized against cell density; 5 – cytoplasmic proteins; 6 – 6 M urea extract of inclusion bodies; 7 – marker proteins (BioRad, SDS-Page standards Low Range). (b) The analysis of samples during full-sized streptavidin production: 1-6 – samples like in (a); 7 – SAV sample after chromatographic purification, 8 – marker proteins (BioRad, Precision Plus Protein Dual Xtra Standards). Molecular masses of standard proteins are shown by numbers on the right side. 15 % polyacrylamide gels stained with Coomassie blue. Arrows show streptavidin bands

(BSA-bio), miniSAV и биотинилированным производным обелина (bio-Obe). Их обнаруживали по биoluminesцентному сигналу обелина при добавлении раствора  $\text{CaCl}_2$ . Величина сигнала прямо пропорциональна количеству сорбированного BSA-bio во всем диапазоне его концентраций (рис. 3).

Этот результат показывает, что полученный нами miniSAV представляет собой стабильный олигомерный белок, способный присоединять одновременно как минимум две биотинилированные молекулы с образованием комплекса сэндвич-типа и может быть использован для этой цели в твердофазном микроанализе.

Синтез рекомбинантного полноразмерного стрептавидина (SAV) осуществляли инкубированием рекомбинантных клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой

pET19b-SAV. За накоплением белка, его локализацией в клетках и чистотой полученного после аффинной хроматографии препарата следили с помощью гель-электрофореза (рис. 2б). Видно, что через 1 ч после индукции (при  $\text{OD}_{600}=0,9$ ) появляется полоса нового белка с мол. массой около 16 кДа, близкой к расчетному значению массы мономера полноразмерного стрептавидина. Вклад этой полосы от всех белков через 1, 3, и 5 ч составил 9, 13 и 13 % соответственно. При этом основное количество белка находится в растворимой фракции (рис. 2б). После хроматографии из клеточного лизата был получен препарат белка высокой степени очистки, выход которого составлял всего 11-13 мг с 1 л культуры. Очевидно, это связано с показанной ранее токсичностью стрептавидина для клеток *E. coli*. Мы предположили, что более поздняя индукция

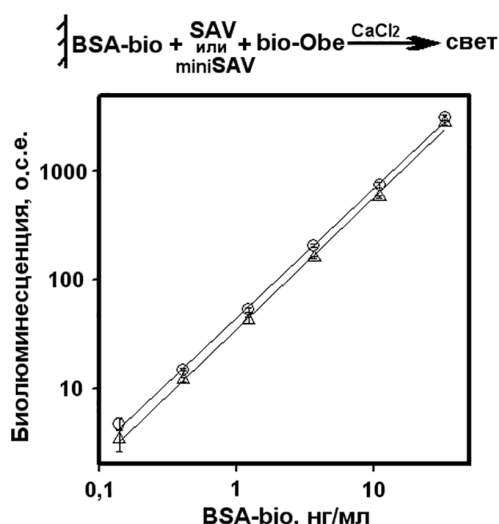


Рис. 3. Применение miniSAV (-○-) и SAV (-△-) в твердофазном биолюминесцентном микроанализе сэндвич-типа. Каждая точка – среднее значение от трех независимых измерений ± среднеквадратичное отклонение. о.с.е. – относительные световые единицы

Fig. 3. Use of miniSAV (-○-) and SAV (-△-) in a solid-phase bioluminescent sandwich-type microanalysis. Each point is the average of 3 independent measurements ± SD

может увеличить выход стрептавидина за счет увеличения количества клеток в момент добавления ИПТГ. При параллельном культивировании трех образцов культуры в одинаковых условиях синтез индуцировали при оптической плотности  $OD_{600}=0,9, 1,9$  или  $2,8$  и культивировали еще 4 ч.

С началом синтеза стрептавидина рост клеток резко замедляется по сравнению с

ростом тех же клеток без индукции (рис. 4). В таблице приведен выход белка в каждом случае. Оказалось, что индукция синтеза стрептавидина при  $OD_{600}=1,9$  всего на полчаса позже, чем при  $OD_{600}=0,9$ , увеличивает продукцию целевого белка более чем в 2 раза, до  $28 \pm 1,4$  мг/л. В случае еще более поздней индукции, при  $OD_{600}=2,8$ , когда культура находится в стадии замедленного роста, выход белка не увеличился и составил  $27 \pm 2,3$  мг/л. При этом небольшое количество белка было обнаружено в культуральной среде, очевидно, из-за начавшегося лизиса клеток. Как видно из кинетики роста культуры (рис. 4), после индукции рост останавливается примерно через 2 ч, после чего продолжать культивирование нецелесообразно.

Колориметрическим методом на основе комплексов с НАВА (Green, 1970) показано, что моль SAV связывает 3,9 моля биотина. В модельном твердофазном анализе полученный полноразмерный стрептавидин так же, как и минимальный коровий, образует комплексы между биотинилированными БСА и обелином (рис. 3).

Таким образом, в поисках наиболее рационального способа получения рекомбинантного стрептавидина нами рассмотрены два его варианта – miniSAV и SAV. Быстрое накопление miniSAV приводит к его осаждению в виде нерастворимых телец включения. Несмотря на очевидные преимущества

Таблица. Результаты культивирования рекомбинантных клеток RIPL/pET19b-SAV

Table. Results of cultivation of the recombinant RIPL/pET19b-SAV cells

Индукция при $OD_{600}$	Количество полученного стрептавидина <sup>1</sup> , мг/л культуры	Количество биомассы, сырой вес, г	Общее время культивирования, ч
0,9	$15,6 \pm 1,2$	$5,2 \pm 0,9$	6,75
1,9	$28,0 \pm 1,4$	$6,7 \pm 0,3$	7,25
2,8	$27,0 \pm 2,3$	$6,3 \pm 0,2$	9

<sup>1</sup>Хроматографически очищенный белок.

такой экспрессии (в осадке белок находится в значительном количестве и практически индивидуальном виде; его легко отделять от остальных цитоплазматических белков центрифугированием; «вывод» белка из раствора цитоплазмы уменьшает вредное воздействие в случае его токсичности), она сопровождается серьезной проблемой фолдинга белка для восстановления его специфической активности. Предсказать локализацию рекомбинантного белка, как и найти оптимальные условия его фолдинга, не всегда удается. Так, ранее нами был получен ряд функционально активных рекомбинантных белков – апофотопротеинов и люцифераз различных организмов, а также гибрид минимального корового стрептавидина с обелином локализованных в клетках *E. coli* исключительно в виде телец включения (см., напр.: Illarionov et al., 2000; Markova et al., 2004; Titushin et al., 2008; Markova et al., 2010; Bashmakova et al., 2017). В то же время суперэкспрессия бактериальной люциферазы *Photobacterium leiognathi* в рекомбинантных клетках *E. coli* RIPL вообще не сопровождается ее выпадением в осадок (неопубликованные данные). Рефолдинг полученного нами miniSAV с помощью часто используемого процесса диализа, к сожалению, обеспечивал низкий выход активного белка – 10-15 % от исходного денатурированного белка.

Полноразмерный стрептавидин при получении с помощью аналогичной экспрессирующей системы аккумулируется в цитоплазме, что приводит к резкому снижению скорости роста клеток из-за его токсичности. Замедление клеточного метаболизма не позволяет накопить значительное количество целевого белка, однако индукция в стадии поздней логарифмической фазы роста увеличила его выход почти в 2 раза. Синтез белка в растворенном виде не создает проблемы фол-

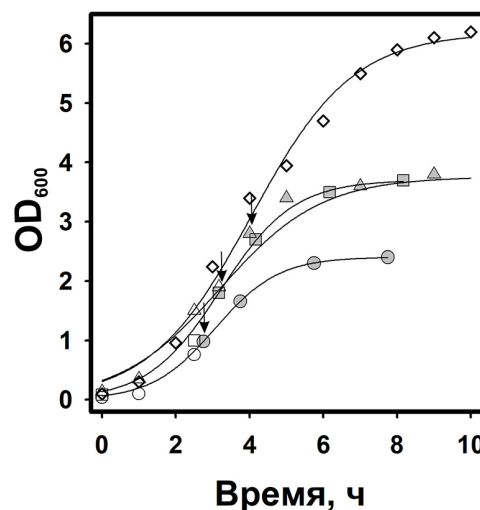


Рис. 4. Кинетика роста культуры *E. coli* RIPL/pET19b-SAV: без ИПТГ-индукции ( $\diamond$ ), с индукцией при оптической плотности  $OD_{600}=0,9$  ( $\circ$ ), 1,9 ( $\square$ ), 2,8 ( $\triangle$ ). Серые символы показывают значения  $OD_{600}$  после индукции. Стрелками показан момент добавления ИПТГ

Fig. 4. Kinetics of *E. coli* RIPL/pET19b-SAV culture growth: without IPTG-induction ( $\diamond$ ), with induction at a density of  $OD_{600}=0.9$  ( $\circ$ ), 1.9 ( $\square$ ), and 2.8 ( $\triangle$ ). Gray symbols indicate the absorbance after induction. Arrows indicate the IPTG introduction

динга: его функциональная активность показана с помощью реакции с НАВА, а также в модельном микроанализе. Таким образом, получение полноразмерного стрептавидина предложенным способом обладает очевидными преимуществами: выход белка высокой очистки составляет около 30 мг с 1 л культуральной среды. Белок легко выделяется одностадийной хроматографией и обладает биоспецифической активностью, близкой таковой для природного белка. Клетки *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)/pET19b-SAV не теряют плазмиду при хранении в 20%-ном глицерине при минус 70 °С, что показано многократными пересевами в течение 2 лет. Штамм хранится в коллекции экстремофильных и типовых культур ИХБФМ СО РАН (Новосибирск), № КЭМТК 3505.



**Список литературы / References**

- Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Grigorenko V.G., Frank L.A. (2017) Hybrid minimal core streptavidin-obelin as a versatile reporter for bioluminescence-based bioassay. *Photochemistry & Photobiology*, 93(2): 548–552
- Bayer E.A., Ben-Hur H., Hiller Y., Wilchek M. (1989) Postsecretory modifications of streptavidin. *Biochemical Journal*, 259(2): 369–376
- Chua L.H., Tan S.C., Liew M.W.O. (2018) Process intensification of core streptavidin production through high-cell-density cultivation of recombinant *E. coli* and a temperature-based refolding method. *Journal of Biotechnology*, 276-277: 34–41
- Dundas C.M., Demonte D., Park S. (2013) Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 97(21): 9343–9353
- Frank L.A., Vysotski E.S. (1997) Bioluminescent immunoassay of alpha-fetoprotein with Ca<sup>2+</sup>-activated photoprotein obelin. *Bioluminescence and chemiluminescence. Molecular reporting with photons*. Hastings J.W., Kricka L.J., Stanley P.E. (eds.) John Wiley & Sons, Chichester, UK, p. 439–442
- Frank L.A. (2010) Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters. *Sensors*, 10(12): 11287–11300
- Frank L.A. (2015) Creation of artificial luciferases to expand their analytical potential. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 18(10): 919–929
- Green N.M. (1970) Spectrophotometric determination of avidin and biotin. *Methods in Enzymology*, 18(A): 418–424
- Gallizia A., de Lalla C., Nardone E., Santambrogio P., Brandazza A., Sidoli A., Arosio P. (1998) Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in *Escherichia coli*. *Protein Expression & Purification*, 14(2): 192–196
- Humbert N., Zocchi A., Ward T.R. (2005) Electrophoretic behavior of streptavidin complexed to a biotinylated probe: a functional screening assay for biotin-binding proteins. *Electrophoresis*, 26(1): 47–52
- Humbert N., Schürmann P., Zocchi A., Neuhaus J.M., Ward T.R. (2008) High-yield production and purification of recombinant T7-tag mature streptavidin in glucose-stressed *E. coli*. *Methods in Molecular Biology*, 418: 101-110
- Jouybari R.M., Sadeghi A., Khansarinejad B., Abbasian S.S., Abtahi H. (2018) Production of recombinant streptavidin and optimization of refolding conditions for recovery of biological activity. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 6(2): 178–185
- Illarionov B.A., Frank L.A., Illarionova V.A., Bondar V.S., Vysotski E.S., Blinks J.R. (2000) Recombinant obelin: Cloning and expression of cDNA, purification and characterization as a calcium indicator. *Methods in Enzymology*, 305: 223–249
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–685
- Markova S.V., Golz S., Frank L.A., Kalthof B., Vysotski E.S. (2004) Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(5): 3212–3217

Markova S.V., Burakova L.P., Frank L.A., Golz S., Korostileva K.A., Vysotski E.S. (2010) Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria* cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(6): 757–765

Noda S., Matsumoto T., Tanaka T., Kondo A. (2015) Secretory production of tetrameric native full-length streptavidin with thermostability using *Streptomyces lividans* as a host. *Microbial Cell Factories*, 14: 5

Sano T., Cantor C.R. (1990) Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(1): 142–146

Sano T., Pandori M.W., Chen X., Smith C.L., Cantor C.R. (1995) Recombinant core streptavidins: a minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. *Journal of Biological Chemistry*, 270(47): 28204–28209

Schmidt T.G.M., Skerra A. (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the “Strep tag” and immobilized recombinant core streptavidin. *Journal of Chromatography A*, 676(2): 337–345

Sørensen H.P., Sperling-Petersen H.U., Mortensen K.K. (2003) A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin. *Protein Expression and Purification*, 32(2): 252–259

Titushin M.S., Markova S.V., Frank L.A., Malikova N.P., Stepanyuk G.A., Lee J., Vysotski E.S. (2008) Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(2): 189–196

Veiko V.P., Gul'ko L.B., Okorokova N.A., D'yakov N.A., Debabov V.G. (1999) Cloning and expression of the streptavidin gene from *Streptomyces avidinii* in *Escherichia coli* and secretion of streptavidin by *E. coli* cells. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 25(3): 161–165