

УДК 574.24

**Влияние митохондриально-направленных антиоксидантов,
производных пластохинона на устойчивость зерновых культур к
водному дефициту**

Дуплий Н.Г., Усатов А.В., Азарин К.В.

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского
Южный федеральный университет*

Аннотация

*В статье представлены результаты исследования влияния производных пластохинона: 10-(6'-пластохинонил) децилтриметилфосфония (SkQ1) и 10-(6'-метилпластохинонил) децилтрифенилфосфония (SkQ3) на устойчивость зерновых культур к дефициту почвенной влаги. Объектом исследования служили проростки ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта «Сокол» и озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Калым». Исследованы показатели скорости роста растений в течение 14 дней в норме и при недостатке влаги, предварительно обработанных 2,5 нм растворами SkQ1 и SkQ3. Показано, что обработка семян растворами SkQ1 и SkQ3 повышает скорость роста исследуемых культур в условиях недостатка влаги по сравнению с контролем. Также в корнях и листьях у 14-дневных проростков ячменя проведен анализ транскрипционной активности генов *SodA1*, *SodB*, *GR*, *GST1*, *GST6*, *Cat1*, *Cat2*, *Apx1*, кодирующих белки окислительного стресса. Показано, что уменьшение влаги в почве в 1,8 и 2,0 раза по сравнению с контролем уменьшает в различной степени вес корней и листьев у 14-дневных проростков ячменя и повышает, как в листьях, так и корнях транскрипционную активность всех исследованных генов. Обработка семян растворами SkQ1 и SkQ3 в условиях дефицита влаги повышает сухой вес корней и листьев ячменя и снижает в корнях транскрипционную активность изученных генов.*

Ключевые слова: ПРОИЗВОДНЫЕ ПЛАСТОХИНОНА, SkQ1, SkQ3, МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ, АФК, ДЕФИЦИТ ПОЧВЕННОЙ ВЛАГИ, УСТОЙЧИВОСТЬ, ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ

Введение

Засуха - наиболее распространенный абиотический стресс, снижающий

урожайность сельскохозяйственных культур в большей степени, чем любой другой фактор [1, 2]. У растений недостаток почвенной влаги приводит к снижению скорости деления клеток, уменьшению размера листьев, нарушению работы устьиц, дисбалансу воды и питательных веществ в растении и, как следствие всего этого, снижению урожайности [3, 4].

Засухоустойчивость определяется как способность растений поддерживать определенный уровень физиологической активности в условиях дефицита влаги [5]. Это достигается за счет регуляции экспрессии большого числа генов (например, генов, связанных с передачей стрессового сигнала) и ряда метаболических путей, которые уменьшают или восстанавливают результирующие стрессовые повреждения [6].

Известно, что ключевым процессом физиологической реакции растений на засуху является продукция активных форм кислорода (АФК), которая вызывает прогрессирующее окислительное повреждение тканей, задержку роста и, в конечном итоге, гибель клеток [7]. Одним из защитных механизмов растений при дефиците влаги является повышенная выработка ферментов-антиоксидантов, таких как *CAT*, *SOD*, *APX*, *GR*, *GST* [8]. Высокое содержание антиоксидантов имеет решающее значение для приобретения растением свойства засухоустойчивости [9].

Поиск и внедрение в агротехнологии новых препаратов на основе антиоксидантов — перспективная и востребованная задача. Одним из путей решения этой проблемы являются низкомолекулярные антиоксиданты, способные, благодаря своей структуре, адресно проникать в митохондрии растительных клеток [10].

Благодаря разработкам научного коллектива под руководством академика В.П. Скулачева был синтезирован ряд таких соединений, относящихся к митохондриально-направленным антиоксидантам [11, 12]. Среди этих веществ наибольшую эффективность продемонстрировала группа соединений, получившая обозначение SkQ. За счёт пластохинона — основы данного класса химических соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, эти вещества потенциально способны восстанавливаться в дыхательной цепи митохондрий, а также обладают хорошей проницаемостью для клеточных мембран [13]. Самый значимый эффект проявили соединения с ионом трифенилфосфония: 10-(6'-пластохинонил) децилтриметилфосфоний (SkQ1) и 10-(6'-метилпластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ3).

Однако, в основном исследования антиоксидантных свойств этих соединений были

проведены на животных. На растениях подобных работ значительно меньше. В последние годы ведутся работы по изучению влияния данных веществ и на растительные организмы, в том числе на устойчивость к экстремальным факторам среды, в частности засухе [14, 15]. В связи с этим целью работы является исследование влияния производных пластохинона (SkQ1 и SkQ3) на устойчивость озимой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) и ярового ячменя (*Hordeum vulgare L.*) к дефициту почвенной влаги.

Материалы и методы

Сухие семена озимой пшеницы сорта «Калым» и ярового ячменя сорта «Сокол» предварительно замачивали в течение 6 ч в дистиллированной воде (контроль) или в растворах SkQ1 и SkQ3, в концентрации 2,5 нМ. Данная концентрация была выбрана на основе проведенных ранее опытов [16]. Затем семена проращивали в термостате в течение 36 ч при температуре 25 °С и далее в контейнерах (по 30 растений) в условиях фитотрона в течение 14 дней при различной влажности почвы. Влажность почвы определяли по ГОСТ 28268–89 [17]. Постоянный уровень влажности субстрата поддерживали регулярным поливом сосудов по весу. Опыт проводили в шести повторностях. После окончания эксперимента измеряли сухую массу ростков и корней растений. Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программного обеспечения Statistica 10.

Для анализа транскрипционной активности генов окислительного стресса, РНК из тканей листьев и корней выделяли по методу Хомчинского [18] с помощью коммерческого набора ExtractRNA (Евроген, Россия). Полученную РНК обрабатывали ДНКазой из коммерческого набора DNase I, Rnase-free (ThermoFisherScientific, США). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием коммерческого набора MMLVRTkit (Евроген, Россия). Полученная кДНК служила матрицей для ПЦР в реальном времени, которую проводили с красителем SYBR Green I (Евроген, Россия), в термоциклере CFX96 (BioRad, США). Для получения проведения реакции ПЦР использовали прямую и обратную последовательность праймеров (табл. 1).

Термальный режим начальной денатурации при 94 °С в течение 3 мин., затем 36 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг праймеров при 58 °С в течение 20 сек., элонгация – 30 сек при 70 °С, денатурация при 95 °С – 10 сек., финальная элонгация – 2 мин. при 70 °С.

Таблица 1. Праймеры, используемые для постановки ПЦР РВ

Ген	Последовательность (5'–3') прямого праймера	Последовательность (5'–3') обратного праймера
<i>HvSodA1</i>	TGGATGGGTGTGGCTAGCTTT	AGTATGCATGCTCCCAGACAT
<i>HvSodB</i>	TACTACGGCCTCACGACTCC	CGGGTTGCCGTTGTTGTAGG
<i>HvGR</i>	GAGCTACGACTACGACCTCTTC	CACGTATCACGCACGTCCC
<i>HvGST1</i>	TCCAAGTACCTGGCTGGAGA	CGGGTAAGCGTCGAACAGAG
<i>HvGST6</i>	AGCATCTCGTCAGAAACCCGT	TCGACCTCGTCCGTCTTGTA
<i>HvCat1</i>	AACTCCGCCTACTGGAAC	ACGTTTCAGGTATGCGTTCCC
<i>HvCat2</i>	ACCGCAACGTCGACAACCTTC	TTGACGGGGAGCATCAGGTA
<i>HvApx1</i>	GAGGTCTGGCTTTGAGGGAC	TCAGCAGAGTTTTGTCACTTGGA
<i>Hvβ-tubulin</i>	GGAGGCTGAGAAGTGTGACTG	TCAGGGTACTCCTCCCTGATT

Для количественного определения уровня транскрипции генов окислительного стресса использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве референсного гена использовали *β-tubulin*. Результирующее значение $\Delta\Delta Ct$ использовалось для определения изменения уровня экспрессии исследуемого гена.

Результаты исследования

Влияние различных режимов почвенного увлажнения на рост и развитие растений озимой пшеницы и ярового ячменя представлены в таблице 2.

Таблица 2. Сухая масса ростков и корней 14-дневных растений озимой пшеницы сорта «Калым» и ярового ячменя сорта «Сокол», выращенных при различных режимах почвенного увлажнения

Вариант опыта	Озимая пшеница сорта «Калым»		Яровой ячмень сорта «Сокол»	
	сухая масса ростка, мг	сухая масса корня, мг	сухая масса ростка, мг	сухая масса корня, мг
Контроль (70 % влажности)	18,7±0,3	6,5±0,1	19,5±0,4	8,5±0,3
50 % влажности	16,1*±0,2	5,2*±0,1	17,7*±0,3	7,8*±0,3
% от контроля	86,0 %	80,0 %	90,7 %	91,7 %
40 % влажности	15,1*±0,2	4,3*±0,1	16,8*±0,2	6,7*±0,2
% от контроля	80,7 %	66,1 %	86,1 %	78,8 %
30 % влажности	10,5*±0,2	4,5*±0,1	11,2*±0,2	3,1*±0,2
% от контроля	56,1 %	69,2 %	57,4 %	36,0 %

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Как видно из таблицы 2, уменьшение почвенной влаги от 70 % до 30 % приводит к резкому снижению сухой массы ростков и корней, как у ярового ячменя, так и у озимой

пшеницы. Так, при снижении влажности до 50 % масса ростков ячменя и пшеницы снижается на 10 % и 15 %, а масса корней на 10 % и 20 %, соответственно. При дальнейшем снижении влаги масса ростков и корней уменьшается более, чем на 50 % по сравнению с контролем.

Для определения эффективности митохондриально-направленных антиоксидантов SkQ1 и SkQ3 на рост и развитие растений в условиях засухи, был проведен сравнительный анализ действия этих соединений на скорость роста озимой пшеницы и ярового ячменя при различных режимах почвенного увлажнения. Результаты эксперимента суммированы в таблице 3.

Таблица 3. Влияние SkQ1 и SkQ3 на сухую массу ростков и корней 14-дневных растений озимой пшеницы сорта «Калым» и ярового ячменя сорта «Сокол», выращенных при различных режимах почвенного увлажнения

Вариант опыта	Озимая пшеница сорта «Калым»		Яровой ячмень сорта «Сокол»	
	сухая масса ростка, мг	сухая масса корня, мг	сухая масса ростка, мг	сухая масса корня, мг
<i>Влажность почвы 70 % (контроль)</i>				
контроль	18,7±0,3	6,5±0,1	19,5±0,4	8,5±0,3
SkQ1	19,2±0,2	6,9±0,2	20,1±0,4	9,0±0,2
<i>% от контроля</i>	<i>102,6 %</i>	<i>105,8 %</i>	<i>103,0 %</i>	<i>105,6 %</i>
SkQ3	19,1±0,2	6,8±0,2	19,7±0,3	8,9±0,3
<i>% от контроля</i>	<i>102,1 %</i>	<i>104,4 %</i>	<i>101,1 %</i>	<i>104,5 %</i>
<i>Влажность почвы 50 %</i>				
контроль	16,1±0,2	5,2±0,1	17,7±0,3	7,8±0,3
SkQ1	17,9*±0,1	6,7*±0,1	18,2±0,2	8,2±0,3
<i>% от контроля</i>	<i>110,1 %</i>	<i>122,4 %</i>	<i>102,8 %</i>	<i>104,9 %</i>
SkQ3	17,5*±0,2	6,5*±0,1	17,9±0,3	8,3±0,2
<i>% от контроля</i>	<i>108,0 %</i>	<i>120,0 %</i>	<i>101,2 %</i>	<i>106,1 %</i>
<i>Влажность почвы 40 %</i>				
контроль	15,1±0,2	4,3±0,1	16,8±0,2	6,7±0,2
SkQ1	18,1*±0,2	5,7*±0,1	19,3*±0,2	7,8*±0,2
<i>% от контроля</i>	<i>116,6 %</i>	<i>124,6 %</i>	<i>113,0 %</i>	<i>114,2 %</i>
SkQ3	17,9*±0,1	5,9*±0,1	19,4*±0,2	8,3*±0,3
<i>% от контроля</i>	<i>115,7 %</i>	<i>127,2 %</i>	<i>113,4 %</i>	<i>119,3 %</i>
<i>Влажность почвы 30 %</i>				

Вариант опыта	Озимая пшеница сорта «Калым»		Яровой ячмень сорта «Сокол»	
	сухая масса ростка, мг	сухая масса корня, мг	сухая масса ростка, мг	сухая масса корня, мг
контроль	10,5±0,2	4,5±0,1	11,2±0,2	3,1±0,2
SkQ1	13,8*±0,2	6,2*±0,1	14,9*±0,3	4,5*±0,2
% от контроля	124,0 %	127,5 %	124,9 %	131,2 %
SkQ3	14,3*±0,1	5,9*±0,1	15,6*±0,3	4,8*±0,2
% от контроля	126,6 %	123,8 %	128,3 %	135,5 %

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Как видно из таблицы 3, в условиях увлажненности почвы оптимальной для нормального роста и развития (70 % от влагоемкости почвы) достоверные отличия между сухой массой проростков и корней у обработанных растений по сравнению с контролем отсутствуют. Однако, при сокращении полива начиная с 50 % влажности для озимой пшеницы масса обработанных SkQ1 и SkQ3 листьев и корней увеличивается в среднем на 10 % и 20 % соответственно. При снижении влажности почвы до 40 % масса ростков и корней растений, обработанных SkQ1 и SkQ3 возрастает в среднем на 15 % и 25 % по сравнению с контролем у пшеницы, и на 15 % и 20 % у ячменя соответственно. При дальнейшем усилении засухи до 30 % влажности почвы влияние производных пластохинона проявляется ещё более выражено. Так масса ростков и корней растений, обработанных SkQ1 и SkQ3, возрастает в среднем на 25 % по сравнению с контролем у пшеницы, и на 25 % и 30–35 % у ячменя соответственно.

Таким образом, в условиях дефицита влаги у растений, обработанных растворами SkQ1 и SkQ3, повышается скорость роста по сравнению с контролем в условиях недостатка влаги. Для дальнейшего изучения влияния SkQ1 и SkQ3 на устойчивость культур к засухе провели анализ транскрипционной активности генов антиоксидантной системы ячменя.

Из многочисленной группы генов, кодирующих ферменты окислительного стресса, нами были выбраны следующие: *HvSodA1*, *HvSodB*, *HvGR*, *HvGST1*, *HvGST6*, *HvCat1*, *HvCat2*, *HvApx1*. Такой выбор сделан не случайно, поскольку данные гены являются наиболее изученными в литературных источниках и значимыми для протекания биохимических реакций с образованием АФК у растений.

Изменение уровня экспрессии в листьях и корнях растений ячменя при влажности почвы 40 % и 30 % представлены на рис. 1 и 2.

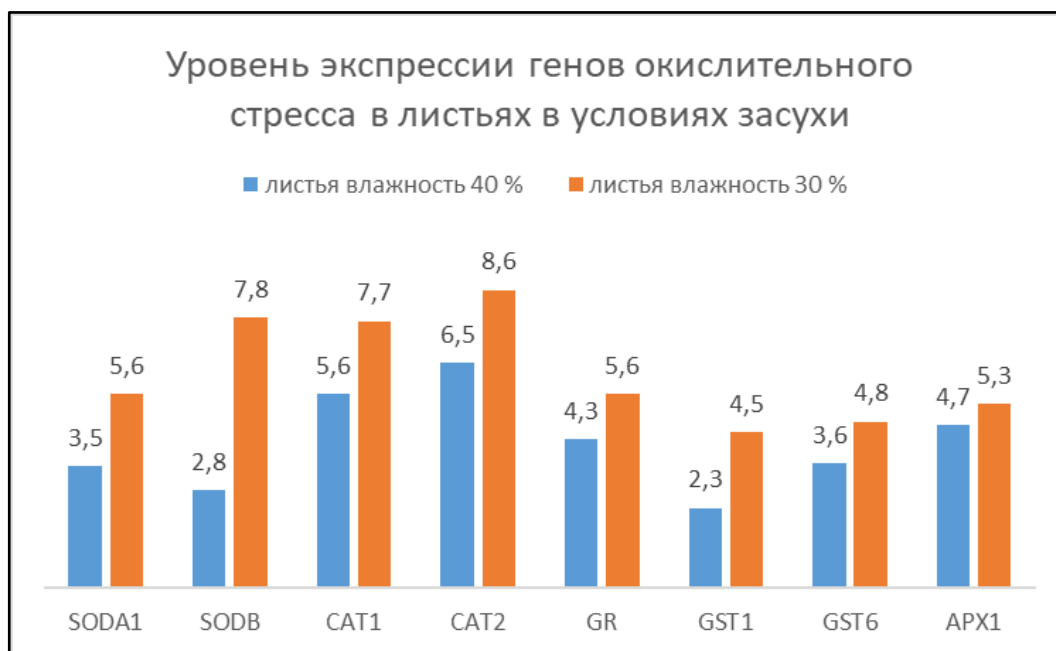


Рис. 1. Уровень экспрессии генов окислительного стресса в листьях ячменя в условиях засухи

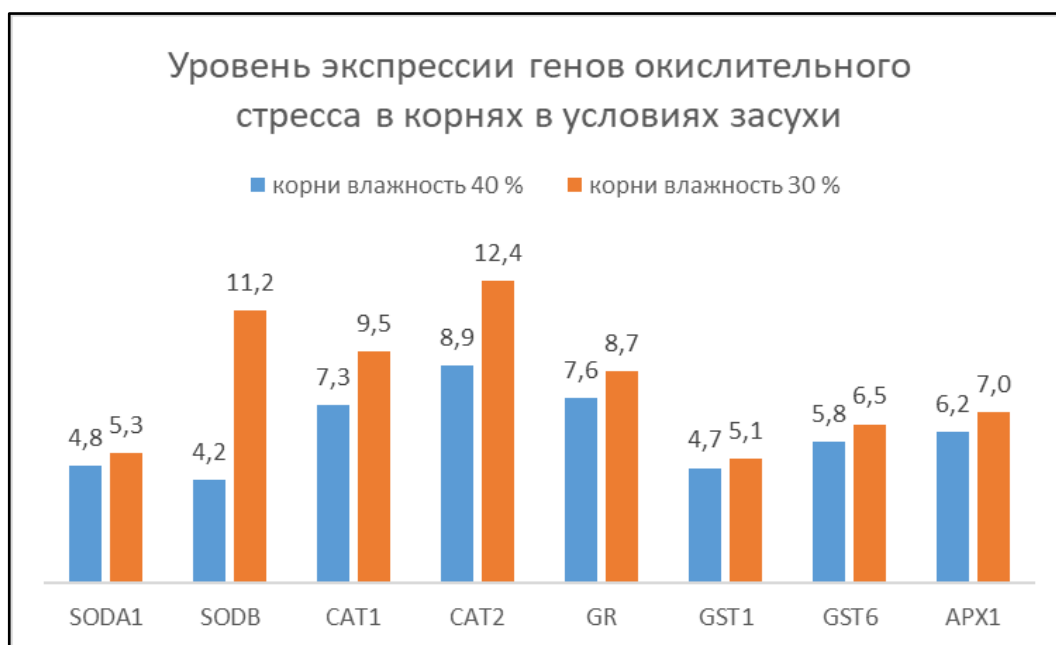


Рис. 2. Уровень экспрессии генов окислительного стресса в корнях ячменя в условиях засухи

Как видно на рис. 1 и 2, под воздействием засухи транскрипционная активность всех исследуемых генов повышается, как в листьях (в 2,3–8,6 раз), так и в корнях (в 4,2–12,4 раз).

Изменение уровня экспрессии в листьях и корнях растений ячменя при обработке растворами SkQ1 и SkQ3 при влажности почвы 40 % представлены на рис. 3 и 4.

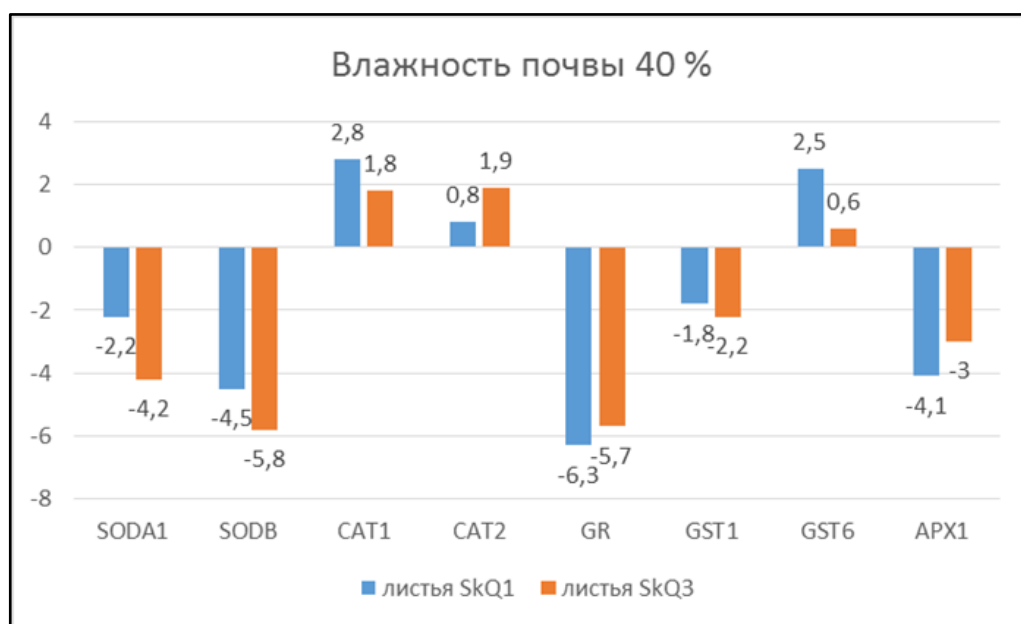


Рис. 3. Влияние SkQ1 и SkQ3 на уровень экспрессии генов окислительного стресса в листьях ячменя при влажности почвы 40 %

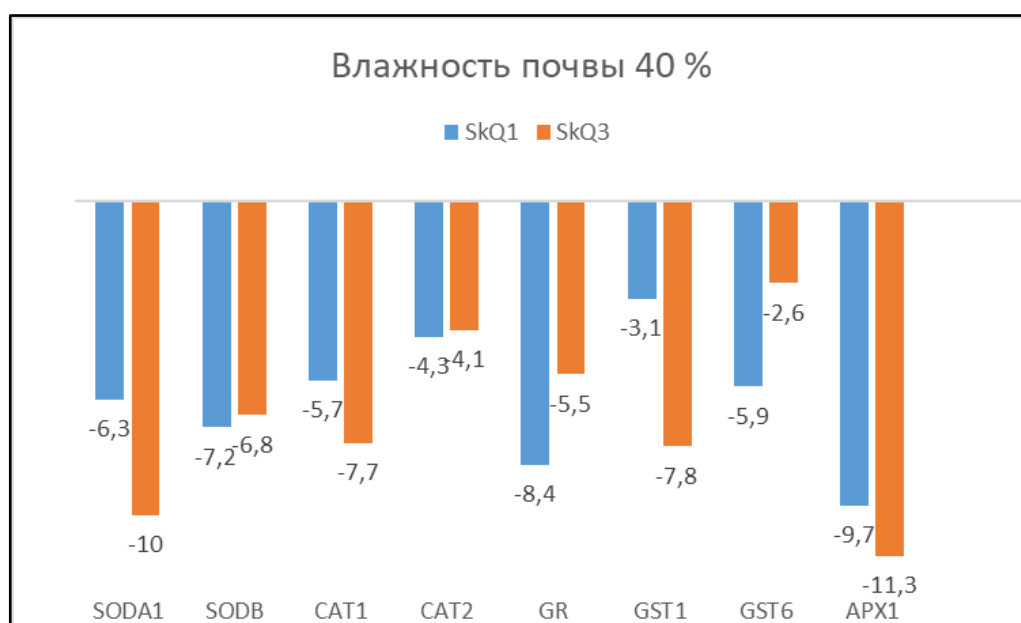


Рис. 4. Влияние SkQ1 и SkQ3 на уровень экспрессии генов окислительного стресса в корнях ячменя при влажности почвы 40 %

Как видно на рис. 3 и 4, уровень экспрессии в листьях и корнях изменяется непропорционально. Так, в листьях уровень экспрессии генов *SOD*, *GR* и *APX1* снижается в 2-6 раз, а генов *CAT1*, *CAT2* и *GST6* незначительно повышается, в корнях же уровень экспрессии всех исследуемых генов снижается в 3-11 раз, как при обработке как SkQ1, так и SkQ3. Таким образом, снижение транскрипционной активности генов, кодирующих

ферменты окислительного стресса ярче проявляется в корнях, чем в листьях.

Дальнейшее снижение уровня почвенной влаги приводит к значительным нарушениям в физиологических и биохимических процессах и к значительному снижению скорости роста и развития растений.

Изменение уровня экспрессии в листьях и корнях растений ячменя при влажности почвы 30 %, что соответствует сильной засухе, представлены на рис. 5 и 6.

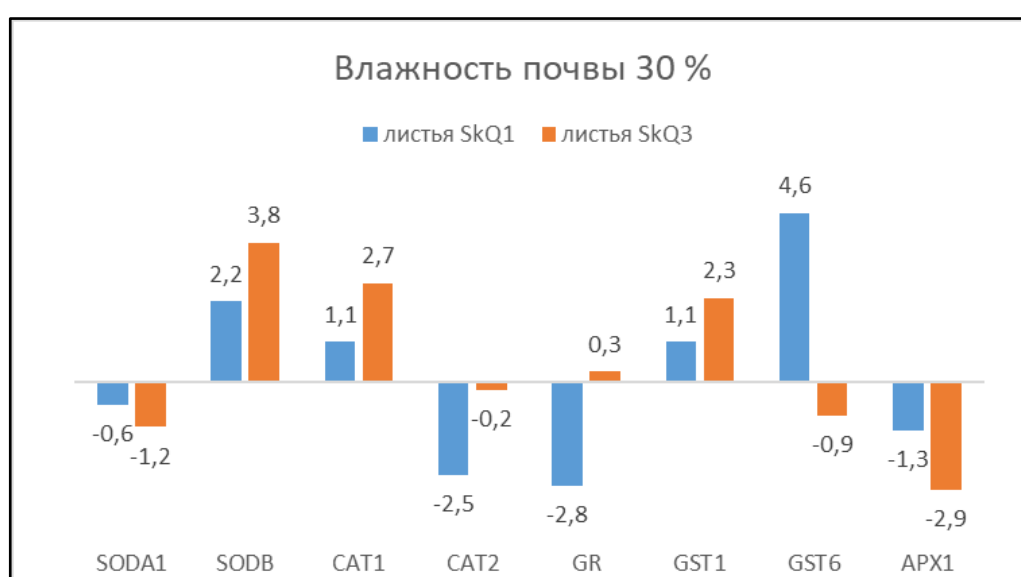


Рис. 5. Влияние SkQ1 и SkQ3 на уровень экспрессии генов окислительного стресса в листьях ячменя при влажности почвы 30 %



Рис. 6. Влияние SkQ1 и SkQ3 на уровень экспрессии генов окислительного стресса в корнях ячменя при влажности почвы 30 %

Как видно на рис. 5 и 6 при обработке растворами SKQ1 и SkQ3 уровень экспрессии всех исследуемых генов в корнях растений также снижается в 0,5–6,5 раз по сравнению с контролем, в то время как в листьях уровень транскрипционной активности генов изменяется неоднозначно. Так, уровень экспрессии генов *SOD*, *CAT2* и *APX1* снижается в 0,2–3 раза, гена *GR* в три раза при обработке SKQ1, однако при обработке SKQ3 незначительно повышается. Уровень экспрессии гена *GST6* незначительно снижается при обработке SKQ3, однако повышается более, чем в 4 раза при обработке SKQ1. Уровень экспрессии генов *SODB*, *CAT1* и *GST1* повышается до 4 раз при обработке SKQ1 и SkQ3.

Заключение

Уменьшение почвенной влаги приводит к резкому снижению скорости роста 14-дневных проростков ярового ячменя сорта «Сокол» и озимой пшеницы сорта «Калым». При обработке семян растворами SkQ1 и SkQ3 сухая масса ростков и корней исследуемых культур в условиях недостатка влаги повышается по сравнению с контролем. Так, при снижении влажности почвы до 40 % масса 14-дневных ростков и корней растений, обработанных SkQ1 и SkQ3 возрастает в среднем на 15 % и 25 % по сравнению с контролем у пшеницы, и на 15 % и 20 % у ячменя, соответственно. С дальнейшим понижением влажности до 30 % масса ростков и корней растений, обработанных SkQ1 и SkQ3 возрастает в среднем на 25 % и 30 % по сравнению с необработанными проростками у пшеницы, и на 25 % и 35 % у ячменя, соответственно.

В условиях засухи при обработке растворами SkQ1 и SkQ3 в корнях растений ячменя транскрипционная активность генов *SodA1*, *SodB*, *GR*, *GST1*, *GST6*, *Cat1*, *Cat2*, *Apx1* снижается по сравнению с контролем, тогда как в листьях данный показатель изменяется неоднозначно, поскольку корни растений сильнее, чем листья реагируют на дефицит влаги. Снижение транскрипционной активности генов антиоксидантной системы может свидетельствовать об уменьшении накопления АФК под действием антиоксидантов и восстановлении баланса окислительно-восстановительных реакций.

Работа выполнена в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023–0008 Мониторинг, моделирование и управление экосистемными функциями и сервисами почв и растений в целях устойчивого развития природных, агро- и урболандшафтов юга России.

Список использованных источников:

1. Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. Ecological biochemistry: allelopathy and defense against herbivores // *Plant physiological ecology*. – Springer, New York, NY, 2008. – P. 445-477.
2. Farooq M. et al. Drought stress in plants: an overview // *Plant responses to drought stress*. – 2012. – P. 1-33.
3. Li Y. et al. Climate change and drought: a risk assessment of crop-yield impacts // *Climate research*. – 2009. – V. 39, № 1. – P. 31-46.
4. Walter J. et al. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses // *Environmental and Experimental Botany*. – 2011. – V. 71, № 1. – P. 34-40.
5. Fang Y., Xiong L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants // *Cellular and molecular life sciences*. – 2015. – V. 72, № 4. – P. 673-689.
6. Zhang W. et al. Identification of maize long non-coding RNAs responsive to drought stress // *PloS one*. – 2014. – V. 9, № 6. – P. E98958.
7. Jiang J. et al. Correlation of drought resistance in grass pea (*Lathyrus sativus*) with reactive oxygen species scavenging and osmotic adjustment // *Biologia*. – 2013. – V. 68, № 2. – P. 231-240.
8. Aslam M., Maqbool M.A., Cengiz R. Mechanisms of drought resistance // *Drought Stress in Maize (Zea mays L.)*. – Springer, Cham, 2015. – P. 19-36.
9. Gong H.J. et al. Effects of silicon on defense of wheat against oxidative stress under drought at different developmental stages // *Biologia Plantarum*. – 2008. – V. 52, № 3. – P. 592-596.
10. Smith R.A.J., Hartley R.C., Murphy M.P. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes // *Antioxidants & redox signaling*. – 2011. – V. 15, № 12. – P. 3021-3038.
11. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species // *Biochemical journal*. – 2009. – V. 417, № 1. – P. 1-13.
12. Скулачев В.П. Попытка биохимиков атаковать проблему старения: "мегапроект" по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы (обзор) // *Биохимия*. – 2007. – Т. 72, № 12. – С. 1700–1714.
13. Antonenko Y.N. et al. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments // *Journal of Membrane Biology*. – 2008. – V. 222, № 3. – P. 141-149.
14. Попов А.С., Овсянникова Г.В., Сухарев А.А., Дуплий Н.Г. Влияние препарата Агримитин на урожайность и качество зерна озимой пшеницы в южной зоне Ростовской области // *Зерновое хозяйство России*. – 2019. - № 3. - С. 14–18.
15. Дуплий Н.Г., Усатов А.В., Азаров А.С. Влияние предпосевной обработки семян 10-(6'-метилпластохинонил) децилтрифенилфосфонием (SkQ3) на скорость роста и урожайность подсолнечника // *Социально-экологические технологии*. – 2021. – № 2. – С.

204–214.

16. Дуплий Н.Г., Азаров А.С., Усатов А.В., Попов А.С. Эффективность применения SKQ3 (10-(6'-метилпластохинонилдецилтрифенилфосфония) при возделывании озимой пшеницы и ярового ячменя в условиях Ростовской области. [Электрон. ресурс] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). – Краснодар: КубГАУ, 2018. – №140(140) - С. 60–72. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2018/06/pdf/22.pdf> DOI: 10.21515/1990-4665-140-022

17. Электронный фонд правовых и право-технических документов [Электрон. ресурс]. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200023556>

18. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analytical biochemistry. – 1987. – V. 162, № 1. – P. 156-159.

Цитирование:

Дуплий Н.Г., Усатов А.В., Азарин К.В. Влияние митохондриально-направленных антиоксидантов, производных пластохинона на устойчивость зерновых культур к водному дефициту [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2024. – № 1. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2024/1/st_132.pdf DOI: <https://doi.org/10.51419/202141132>.