

УДК 581.1

## ДЕЙСТВИЕ СТРЕССОВЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА МЕТАБОЛИЗМ СТЕРИНОВ *Triticum aestivum* L.

© 2021 г. А. Г. Ренкова<sup>а,\*</sup>, В. Р. Хабибрахманова<sup>б</sup>, Ю. Н. Валитова<sup>а</sup>,  
Ф. К. Мухитова<sup>а</sup>, Ф. В. Минибаева<sup>а,с</sup>

<sup>а</sup>Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Казанский национальный исследовательский технологический университет”, Казань, Россия

<sup>с</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
“Казанский (Приволжский) федеральный университет”, Казань, Россия

\*e-mail: renkova@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 22.06.2020 г.

После доработки 21.07.2020 г.

Принята к публикации 21.07.2020 г.

Проблема стрессовой устойчивости сельскохозяйственных растений традиционно находится в фокусе пристального внимания исследователей. Как известно, яровая пшеница проявляет высокую чувствительность к действию различных стрессовых факторов. Важную роль в формировании стрессовой устойчивости растений играют вторичные метаболиты. В настоящей работе методами тонкослойной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии комплексно изучены состав и особенности изменения содержания тритерпенов и стериннов в корнях и листьях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. при действии стрессовых фитогормонов – абсцизовой кислоты, метилжасмоната и салициловой кислоты. Выявлены значительные изменения тритерпенового и стеринового компонентов пшеницы, а также уровня транскриптов ключевых генов стеринового биосинтеза. Обнаружено, что листья и корни проростков пшеницы проявляют различную чувствительность к действию фитогормонов. Полученные данные способствуют расшифровке роли мембранных стериннов в стрессовых ответах растений.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, тритерпены, стерины, гены, фитогормоны

**DOI:** 10.31857/S0015330321020159

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема стрессовой устойчивости сельскохозяйственных растений – предмет пристального внимания исследователей в течение многих лет. Как известно, одна из важнейших сельскохозяйственных культур, пшеница, проявляет высокую чувствительность к действию различных стрессовых факторов. В связи с этим актуально выявление эндогенных механизмов защиты растений пшеницы с целью направленного повышения их устойчивости к действию неблагоприятных факторов окружающей среды. Важную роль в формировании стрессовой устойчивости растений играют вторичные метаболиты, в том числе изопреноиды,

фенолы, необычные жирные кислоты и другие соединения. К одной из самых многообразных и многочисленных групп вторичных метаболитов растений относятся изопреноиды. В эту группу входят тритерпены (C<sub>30</sub>) и стерины (C<sub>18</sub>–C<sub>29</sub>) – структурно разнообразные молекулы, которые, по большей части, недоступны химическому синтезу [1]. В растениях эти соединения синтезируются по мевалонатному пути из сквалена (рис. 1). В ходе биохимических превращений сначала образуются тритерпены – циклоартенол и ланостерин, из которых далее синтезируются различные стерины, такие как β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин и холестерин [2]. Стерины являются важным структурным элементом биологических мембран, а также предшественниками регуляторных гормонов brassinosterоидов, регулирующих рост и развитие растений [3]. В отличие от животных и грибов, где преобладает один стерин (холестерин и эргостерин соответственно), растения характеризуются сложным стериновым со-

**Сокращения:** ГХ–МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия; МеЖ – метилжасмонат; СК – салициловая кислота; CAS – циклоартенол синтаза; CYP710A – C22-стерин десатураза; HMGR – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктаза; SMT – C24-стерин метилтрансфераза; SQE – сквален эпоксидаза; SQS – сквален синтаза

ставом. В частности, стеринный профиль растений *Arabidopsis thaliana* включает в себя  $\beta$ -ситостерин в качестве основного соединения (64%), а также 24-метилхолестерин (11%), стигмастерин (6%), изофукостерин (3%) и брассикастерин (2%) и несколько других минорных стеринов [4]. Мевалонатный путь биосинтеза стеринов представляет собой последовательность более чем 30 ферментативно-катализируемых реакций, протекающих в мембранах (рис. 1) [2]. Ключевыми ферментами биосинтеза растительных стеринов, определяющих соотношение их молекулярных видов, являются С24-стерин метилтрансфераза 1 (SMT1), С24-стерин метилтрансфераза 2 (SMT2) и С22-стерин десатураза (CYP710A) [4–6].

С24-стерин метилтрансфераза катализирует перенос метильной группы от S-аденозил-L-метионина на субстрат с образованием метил-/этилстеринов. Выделяют два фермента SMT, катализирующих первичное и вторичное метилирование, соответственно, SMT1 и SMT2. Предполагают, что С24-метилирование является ключевым регулятором биосинтеза стеринов, от которого зависит получение конечного продукта. С22-стерин десатураза, или CYP710A, относится к подсемейству растительных белков цитохрома P450, семейства 710A, катализирует реакцию десатурации, в результате которой происходит образование стигмастерина из  $\beta$ -ситостерина. Показано, что данная реакция является важной точкой, координирующей соотношение  $\beta$ -ситостерина и стигмастерина, значительные изменения которого происходят в стрессовых условиях [5, 7, 8].

В настоящее время становится ясно, что наряду со структурной функцией, стеринны играют роль в регуляции внутриклеточных процессов. При действии различных стрессовых факторов меняется соотношение молекулярных видов стеринов и их общее содержание, происходит изменение содержания специфических вторичных метаболитов, в том числе тритерпенового ряда, и активности стресс-индуцируемых генов. Необходимым этапом при формировании ответной реакции растения на действие биотических и абиотических стрессовых факторов является выработка растительными клетками фитогормонов, таких как абсцизовая кислота (АБК), метилжасмонаты (МеЖ) и салициловая кислота (СК). Например, известно, что содержание АБК увеличивается при солевом стрессе и засухе, а МеЖ и СК при раневом стрессе и атаке патогенов [9, 10]. Кроме того, фитогормоны могут регулировать экспрессию многих генов, имеющих индуцируемые фитогормонами *цис*-регуляторные элементы в промоторах [11]. К сожалению, роль фитогормонов в регуляции биосинтеза тритерпенов и стеринов в клетках растений в условиях стресса остается малоизученной.

Цель работы – анализ качественных и количественных изменений содержания тритерпенов и стеринов, а также уровня транскриптов ключевых генов ферментов биосинтеза стеринов в корнях и листьях проростков яровой пшеницы при действии фитогормонов АБК, МеЖ и СК.

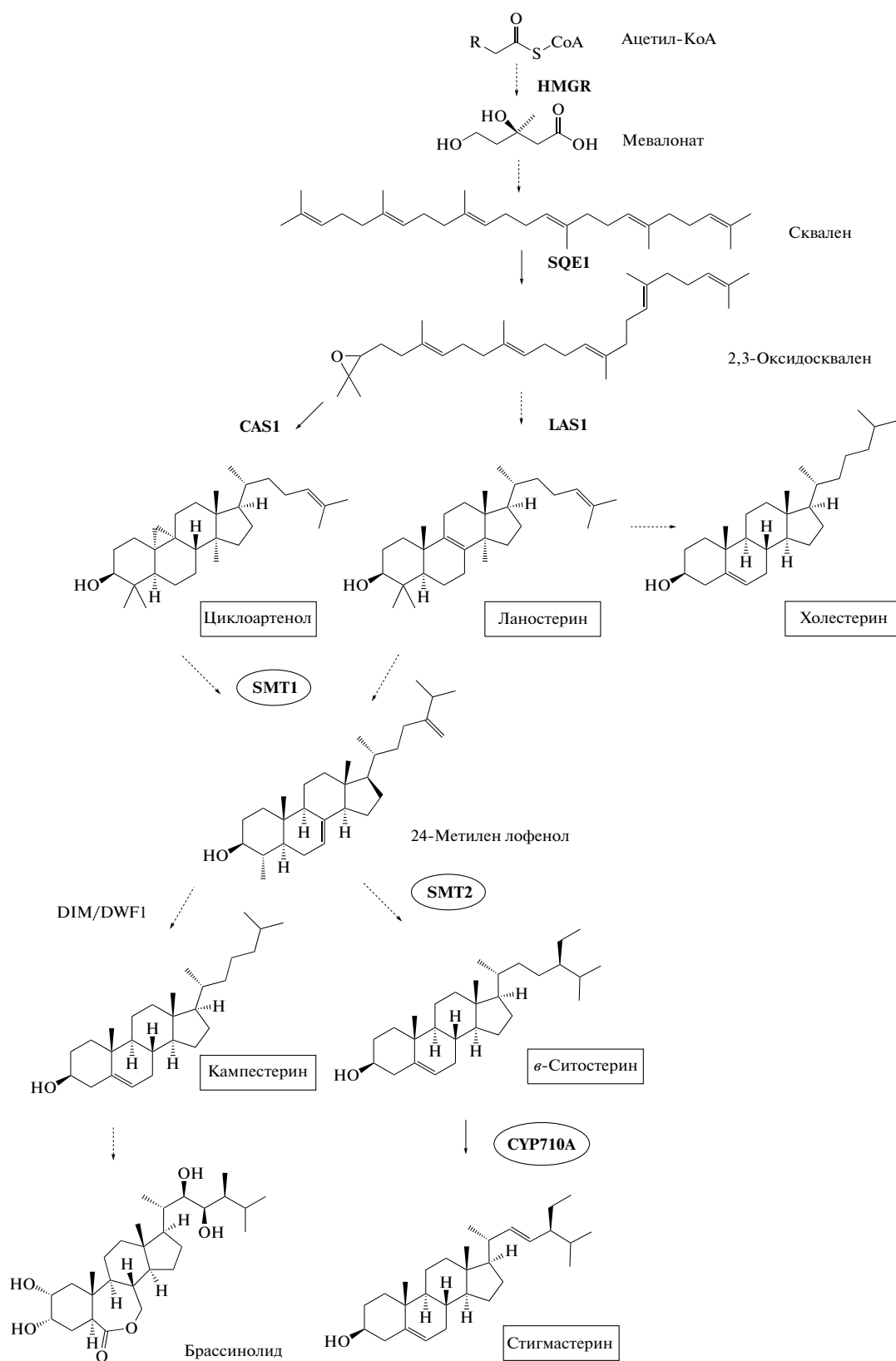
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** В качестве объекта исследований использовали проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта “Казанская юбилейная”. Растения выращивали на 0.25 мМ CaCl<sub>2</sub> при температуре  $+22 \pm 1^\circ \text{C}$  и освещенности 100 Вт/м<sup>2</sup> с 12 ч фотопериодом в течение 4 суток. Затем растения перемещали в растворы фитогормонов АБК, МеЖ и СК в концентрациях 100 мкМ в течение 12 ч. Фитогормоны растворяли в 0.25 мМ CaCl<sub>2</sub>.

**Определение содержания тритерпенов и стеринов.** Образцы пшеницы экстрагировали смесью изопропанола и хлороформа. Для разделения и идентификации липидных соединений в полученных экстрактах использовали метод ТСХ. Исследование осуществляли на лабораторном комплексе для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (“САМАГ”, Швейцария). В состав комплекса входят приборы: Linomat 5 для автоматического нанесения образцов на ТСХ пластину, ADS 2 для элюирования ТСХ пластины в системе растворителей, TLS Scanner 3 для денситометрической обработки ТСХ пластин. Работа комплекса и обработка полученных результатов осуществлялась с помощью специализированной компьютерной программы winCATS, версия 1.4.9. Для количественного определения в образцах тритерпенов и стеринов использовали калибровочные графики по стандартам – циклоартенолу (08172, “Sigma-Aldrich”, США) и  $\beta$ -ситостерину (132720050, “Acros Organics”, Бельгия).

**Идентификация молекулярных видов стеринов.** Состав стеринов анализировали с помощью газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ–МС) (GC-17A/MS-QP5050, “Shimadzu”, Япония). Выделенные стеринны предварительно подвергали силилированию. Идентификацию стеринов проводили путем сравнения их времен удержания с достоверными стандартами масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометрической библиотеки данных ГХ–МС [12]. Количественную обработку осуществляли с использованием специализированной компьютерной программы UNICHROM (<http://www.unichrom.com>).

**Анализ экспрессии генов.** Относительный уровень транскриптов генов С24-стерин метилтрансфераз и С22-стерин десатураз определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР–РВ). Для этого были подобраны ген-специфичные прай-



**Рис. 1.** Схема пути биосинтеза стерина у растений. HMGR – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктаза; SQE1 – сквален эпоксидаза; CAS1 – циклоартенол синтаза; LAS1 – ланостерин синтаза; SMT1/2 – C24-стерин метилтрансфераза; DIM/DWF1 – стерин- $\Delta$ 24-изомераз/редуктаза; CYP710A – C22-стерин десатураза. Пунктирные стрелки обозначают несколько ферментативных реакций. Прямоугольником показаны метаболиты, которые количественно были определены в этом исследовании. Овалом выделены ферменты, анализ генов которых проводился в данном исследовании.

**Таблица 1.** Содержание тритерпенов и стеридов в корнях и листьях проростков пшеницы при действии фитогормонов

Воздействие	Содержание, мкг/г сырой массы			
	тритерпены		стериды	
	корни	листья	корни	листья
Контроль	28.39 ± 1.15	261.71 ± 4.41	150.93 ± 1.18	305.89 ± 5.41
АБК	50.99 ± 1.77	544.20 ± 3.14	160.54 ± 0.72	492.09 ± 2.70
МеЖ	47.79 ± 0.99	213.62 ± 8.26	114.87 ± 1.13	576.49 ± 2.29
СК	14.45 ± 1.18	607.52 ± 10.8	117.69 ± 2.37	445.37 ± 4.13

меры с использованием Universal ProbeLibrary Assay Design Centre (<http://lifescience.roche.com/shop/en/global/overviews/brand/universal-probe-library>) и проведены эксперименты по оптимизации реакции при различной температуре и концентрации праймеров. Праймеры синтезировали в ЗАО “Евроген” (Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в таблице S1 (Supplementary). Тотальную РНК пшеницы выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия), согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (“Bio-Rad”, США) с использованием набора MMLV RT Kit (“Евроген”, Россия). ПЦР–РВ проводили с использованием готовой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) при следующих условиях: 95°C – 5 мин, 40 циклов амплификации (95°C – 15 сек, 55/60°C – 10 сек, 72°C – 30 сек), 55/60°C – 0.5 сек, 95°C – 5 сек. Количество целевых транскриптов оценивали относительно стабильно экспрессирующихся транскриптов референсных генов, в качестве которых были использованы гены фактора АДФ-рибозилирования (*TaARF*), ингибитора РНКазы L-подобного белка (*TaRLI*) и белка контроля клеточного деления (*TaCDC*) [13]. Амплификацию и флуоресцентный мониторинг проводили с использованием системы детекции ПЦР–РВ CFX96 (“Bio-Rad”, США). Расчеты относительного содержания транскриптов были выполнены с использованием сравнительного ΔСТ метода [14]. Нуклеотидные последовательности исследуемых генов определяли с помощью ДНК-анализатора ABI 3130 Genetic Analyser (“Applied Biosystems”, США) [6].

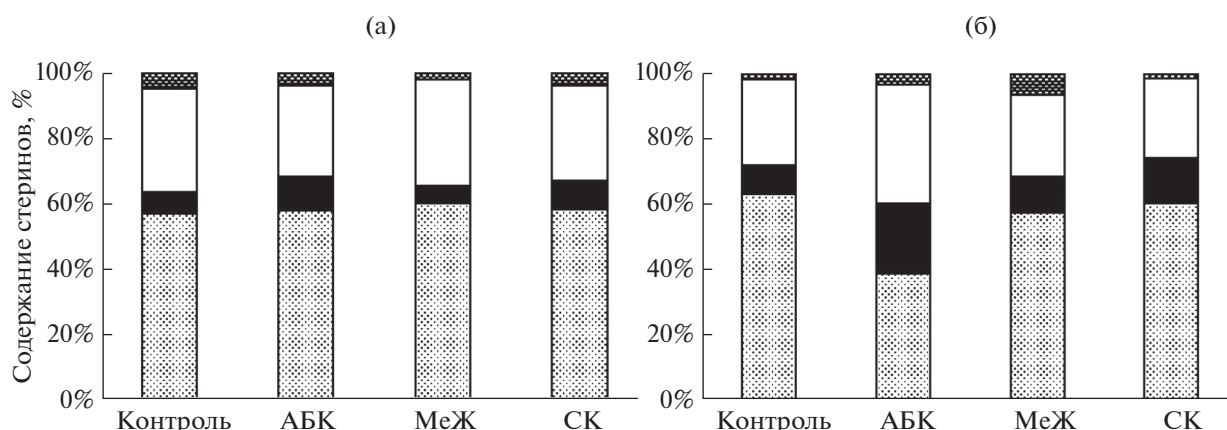
**Статистический анализ.** Все опыты проводили как минимум в трех биологических и четырех аналитических повторностях. В таблицах и на рисунках данные представлены в виде среднеарифметических значений и их стандартных отклонений. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента в Microsoft Excel 2013.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Количественное определение тритерпенов и стеридов в корнях и листьях проростков пшеницы*

Анализ тритерпенов и стеридов в растениях контрольного варианта показал, что их содержание было значительно выше в листьях, чем в корнях, почти в 10 и 2 раза, соответственно (табл. 1). При действии фитогормонов наблюдались изменения в содержании тритерпенов и стеридов в корнях и листьях проростков пшеницы. Воздействие АБК приводило к активации синтеза тритерпенов и стеридов в корнях и листьях. Содержание тритерпенов в исследуемых объектах увеличивалось в 2 раза по сравнению с контролем. В отличие от корней, в листьях проростков наблюдалось значительное возрастание (более чем в 1.5 раза) содержания стеридов в присутствии АБК (табл. 1). Действие МеЖ индуцировало обратные направленные изменения как в содержании тритерпенов, так и в содержании стеридов. Содержание тритерпенов в корнях увеличивалось, тогда как в листьях мы наблюдали незначительное уменьшение. Содержание стеридов, наоборот, уменьшалось в корнях и увеличивалось почти в 2 раза в листьях (табл. 1). Действие СК вызывало снижение содержания тритерпенов и стеридов в корнях проростков, тогда как в листьях их количество значительно возросло (табл. 1).

Качественный состав стеридов и их количество определили методом ГХ–МС. В корнях и в листьях пшеницы были обнаружены основные молекулярные виды стеридов – β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин и холестерин (рис. 2). Установлено, что при действии фитогормонов происходили изменения в содержании стеридов в корнях и листьях пшеницы. На рисунке 2 приведены данные расчета содержания идентифицированных стеридов в процентном соотношении. Значительные изменения в составе стеридов были выявлены при действии АБК на проростки пшеницы, наблюдалось увеличение содержания стигмастерина практически в 2 раза как в корнях, так и в листьях (рис. 2). Стоит отметить, что в листьях увеличение стигмастерина сопровождалось



**Рис. 2.** Содержание молекулярных видов стерина в корнях (а) и листьях (б) пшеницы при действии фитогормонов в процентном соотношении от общего количества стерина. Последовательность распределения стерина в гистограмме снизу вверх: β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин, холестерин. Представлены данные среднеарифметических значений из трех независимых повторностей. Относительное стандартное отклонение среднего не превышало 5%.

значительным уменьшением содержания β-ситостерина (рис. 2б). При действии МеЖ в листьях происходило увеличение доли холестерина, соотношение других видов стерина практически не менялось по сравнению с контролем. При действии СК мы также наблюдали увеличение содержания стигмастерина как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы (рис. 2).

Отличительной структурной особенностью основных растительных стерина, по сравнению с холестерином, является наличие метильных или этильных групп при 24 атоме углерода боковой цепи [2]. По этому признаку растительные стерин делят на 24-метил- и этилстерин. Кампестерин содержит только одну метильную группу при С24, а β-ситостерин и стигмастерин характеризуются наличием этильной группы при С24. В настоящее время известно, что соотношение количества 24-метил-/этилстерина является важным показателем метаболизма растений, а его регуляция — ключевым звеном многих процессов роста, развития, а также стрессовых ответов растений [15].

Анализ изменений в соотношении 24-метил-/этилстерина в корнях и листьях проростков пшеницы при действии фитогормонов показал, что в растениях контрольного варианта соотношение содержания 24-метилстерина к 24-этилстеринам в листьях было ниже, чем в корнях (табл. 2). При действии АБК в корнях соотношение количества 24-метил-/этилстерина не меня-

лось, тогда как в листьях увеличивался показатель соотношения, что говорит об увеличении доли относительного содержания кампестерина. При действии МеЖ незначительно увеличивалась доля метилстерина в корнях, тогда как в листьях она оставалась прежней. При действии СК соотношение количества 24-метил-/этилстерина в корнях также оставалось неизменным, тогда как в листьях наблюдалось уменьшение соотношения 24-метил-/этилстерина вследствие увеличения относительной доли 24-этилстерина — β-ситостерина и стигмастерина (табл. 2).

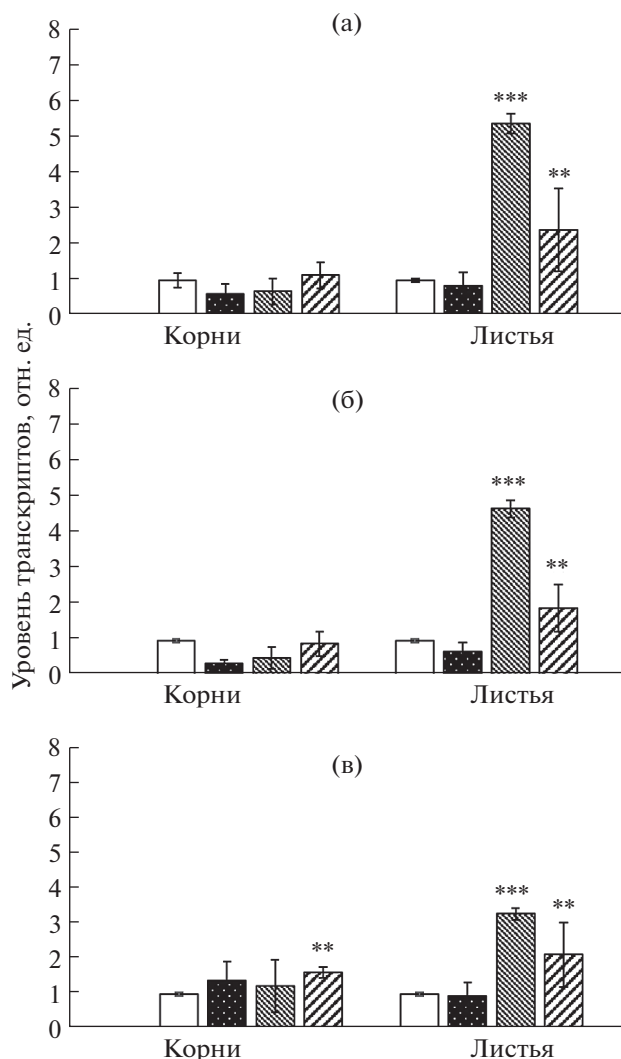
Можно полагать, что изменения содержания тритерпенов и стерина при действии фитогормонов обусловлены также изменениями на геномном уровне. В связи с этим, нами был проведен анализ уровня транскриптов генов, контролирующих биосинтез стерина.

#### *Экспрессия генов биосинтеза стерина при действии фитогормонов*

Известно, что мягкая пшеница (*T. aestivum*) обладает одним из сложнейших геномов, встречаемых у растений. Аллогексаплоидный геном пшеницы ( $2n = 6x = 42$ , AABBDD) образован в ходе естественной гибридизации трех геномов. В связи с этим многие гены у данного злака представлены в трех гомеологичных копиях. Нуклеотидные последовательности генов *TaSMT1* были ранее нами кло-

**Таблица 2.** Соотношение 24-метил-/этилстерина в корнях и листьях проростков пшеницы при действии фитогормонов

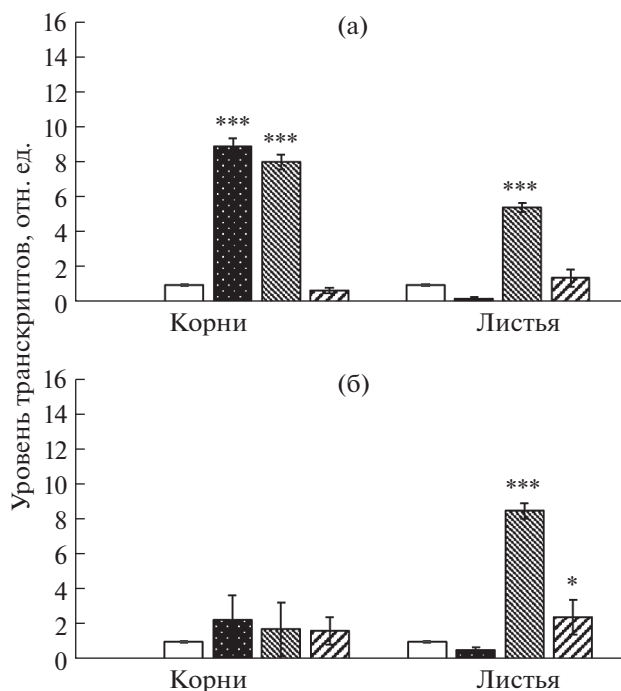
	Контроль	АБК	МеЖ	СК
Корни	0.43 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.50 ± 0.08	0.43 ± 0.01
Листья	0.35 ± 0.02	0.60 ± 0.07	0.37 ± 0.01	0.32 ± 0.01



**Рис. 3.** Влияние фитогормонов на уровень транскриптов генов *TaSMT1-5A* (а) и *TaSMT1-4D* (б) и *TaSMT2* (в) в корнях и листьях пшеницы. Варианты воздействий (слева направо): контроль, АБК, МеЖ, СК. Уровень транскриптов контрольных вариантов принят за единицу. Различия достоверны при \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$  и \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

нированы и секвенированы [6], нуклеотидные последовательности генов *TaSMT2* и *TaCYP710A8* были взяты из статьи Tang с соавт. [16]. Кроме того, ранее нами было проведено секвенирование промоторных областей генов *TaSMT1-5A/-4B/-4D* и их анализ на наличие консервативных сайтов, а также стресс-чувствительных *цис*-элементов [6].

Так, относительное содержание транскриптов генов *TaSMT1-5A*, *TaSMT1-4D* и *TaSMT2* при действии всех фитогормонов практически не изменялось в корнях проростков пшеницы, лишь незначительное повышение уровня транскриптов гена *TaSMT2* мы наблюдали при действии СК (рис. 3в). В листьях так же, как и в корнях, действие АБК не вызывало изменений в уровне тран-



**Рис. 4.** Влияние фитогормонов на уровень транскриптов генов *TaCYP710A8-3A* (а) и *CYP710A8-3B/3D* (б) в корнях и листьях пшеницы. Варианты воздействий (слева направо): контроль, АБК, МеЖ, СК. Уровень транскриптов контрольных вариантов принят за единицу. Различия достоверны при \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$  и \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

скриптов генов *TaSMT1* и *TaSMT2* (рис. 3). Напротив, в листьях при действии МеЖ уровень транскриптов генов *TaSMT1-5A* и *TaSMT1-4D* увеличивался в 5 раз, а *TaSMT2* в 3 раза. Влияние СК также повышало уровень транскриптов генов *TaSMT1* и *TaSMT2* примерно в 2 раза (рис. 3).

Анализ генов *CYP710A8* показал, что при действии АБК в корнях наблюдалось 10-кратное увеличение относительного содержания транскриптов гена *TaCYP710A8-3A*, а уровень транскриптов *TaCYP710A8-3B/3D* повышался незначительно (рис. 4). В листьях, напротив, изменения уровня транскриптов генов *TaCYP710A8* не происходило. Действие МеЖ также индуцировало повышение уровня транскриптов гена *TaCYP710A8-3A* в корнях в 8 раз, а в листьях в 6 раз (рис. 4а). Относительное содержание транскриптов другого гена, *TaCYP710A8-3B/3D*, в корнях практически оставалось на уровне контроля, а в листьях значительно повышалось (в 8 раз) (рис. 4б). Действие СК индуцировало только повышение уровня транскриптов генов *TaCYP710A8-3B/3D* примерно в 3 раза в листьях (рис. 4б) и не приводило к значительным изменениям уровня транскриптов генов *TaCYP710A8* в корнях проростков пшеницы (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Растения обладают богатым стеринным составом, что определяет их вовлечение в разнообразные процессы жизнедеятельности растения, в том числе, в их ответы на стрессовые факторы. Стерины являются важными компонентами клеточных мембран, а также предшественниками гормонов brassinостероидов, участвующих в регуляции роста растений. Тритерпены – вторичные метаболиты, участвующие, в том числе, в защитных реакциях растений. Путь биосинтеза стеринов при стрессе может претерпевать различные изменения, приводя к накоплению промежуточных соединений, которые могут способствовать адаптации растений к воздействиям неблагоприятных факторов окружающей среды. Циклоартенол и ланостерин являются тритерпенами и представляют собой промежуточные продукты биосинтеза стеринов. Их накопление может привести к активации генов ферментов биосинтеза стеринов и, соответственно, к увеличению их содержания. Результаты наших экспериментов показали, что листья и корни проростков пшеницы проявляют различную чувствительность к действию стрессовых фитогормонов.

АБК контролирует в растениях множество жизненно важных процессов, таких как регуляция покоя семян и почек, ранние этапы онтогенеза, закрывание устьиц, ответные реакции растений на стрессовые воздействия – засуху, засоление, пониженную температуру [9]. Показано, что растительные стерины предотвращают вызванное АБК нарушение искусственных бислоев фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин. Влияние АБК на мембраны в равной степени ингибируется растительными стеринами и холестерином, что может свидетельствовать об участии растительных стеринов в контроле негативного действия АБК на мембраны [17]. Экзогенное действие АБК на растения *Cannabis sativa* L. индуцировало накопление вторичных метаболитов, таких как  $\alpha$ -токоферол и тетрагидроканнабинол, и значительно снижало содержание хлорофилла, каротиноидов, сквалена, стигмастерина,  $\beta$ -ситостерина, а также активность 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (HMGR) [18]. В наших экспериментах при действии АБК мы наблюдали увеличение абсолютного содержания тритерпенов и стеринов как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы (табл. 1). Можно полагать, что в растениях при действии АБК происходят изменения в состоянии мембран, что, в свою очередь, индуцирует накопление промежуточных (циклоартенола и ланостерина) и конечных (стеринов) продуктов мевалонатного пути биосинтеза.

Жасмонаты обладают разнообразной биологической активностью, включая ингибирование прорастания семян и пыльцы или ингибирование

роста корней и активности фотосинтетического аппарата [19]. Известно, что МеЖ индуцирует биосинтез многих вторичных метаболитов, играющих важную роль в адаптации растений к биотическому стрессу [20]. Наиболее значимой функцией МеЖ является участие в ответных реакциях при повреждении растений патогенами и насекомыми. СК является ключевой сигнальной молекулой в регуляции защиты растений от патогенов. Действие МеЖ и СК вызывает у растений состояние, возникающее при атаке патогенов, в результате чего происходит увеличение концентрации метаболитов, участвующих в защитных механизмах. В некоторых работах МеЖ и СК использовали как индукторы синтеза флавоноидов и полифенолов в клеточной суспензии, каллусах и тканевых культурах различных семейств растений [21]. У *Medicago truncatula* МеЖ индуцирует накопление сапонинов и активность генов, кодирующих ранние ферменты образования тритерпенового агликона в культурах клеточной суспензии [22]. В наших экспериментах при действии МеЖ была выявлена обратная взаимосвязь между изменениями в содержании тритерпенов и стеринов. Уменьшение содержания стеринов в корнях сопровождалось увеличением содержания тритерпенов, а в листьях, напротив, в присутствии МеЖ уменьшение тритерпенов сопровождалось увеличением стеринов (табл. 1). Наличие таких согласованных изменений тритерпенов и стеринов может свидетельствовать об общей функциональной активности этих метаболитов и предполагает компенсаторный характер изменений. При действии СК мы наблюдали прямую зависимость изменений содержания тритерпенов и стеринов (табл. 1). Снижение уровня тритерпенов в корнях на фоне СК сопровождалось снижением стеринов, а значительное повышение уровня тритерпенов в листьях – увеличением стеринов. Аналогичный эффект был показан в одной из работ, где экзогенное применение СК значительно увеличивало синтез вторичных метаболитов (кумаринов, стеринов, ксантопротеинов, сердечных гликозидов и сапонинов) в листьях растений *Simarouba glauca* в условиях водного стресса [23]. Таким образом, значительные изменения при действии всех фитогормонов наблюдались в содержании тритерпенов по сравнению с изменениями уровня стеринов, что, возможно, связано с более ранним образованием тритерпеновых продуктов в процессе биосинтеза стеринов.

В условиях стресса важным для обеспечения функциональной активности мембран является поддержание соотношения 24-метил-/этилстеринов. Ранее нами было показано увеличение относительного содержания 24-этилстеринов в листьях пшеницы в условиях кратковременного холодового стресса, что, возможно, является одним из механизмов, способствующих повышению устойчивости мембран к изменению температур. Более дли-

тельное (12 ч) воздействие низкой температуры сопровождалось восстановлением соотношения 24-метил-/этилстерина до контрольного уровня и в корнях, и в листьях [24]. В настоящих экспериментах заметные изменения соотношения 24-метил-/этилстерина в сторону увеличения доли метилстерина наблюдались в корнях при действии МеЖ и в листьях при действии АБК (табл. 2). В листьях при действии СК обнаружено небольшое увеличение доли этилстерина, главным образом, стигмастерина. Содержание стигмастерина в корнях и листьях увеличивалось при действии АБК и СК (рис. 2). Известно, что активация синтеза стигмастерина происходит во время абиотического стресса, гравистимуляции, атаки патогенов и в ответ на сигнальные молекулы, такие как АБК, МеЖ, СК, кальций ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [25]. В растениях *A. thaliana* показано патоген-индуцированное увеличение содержания стигмастерина, что, в свою очередь, приводило к уменьшению проницаемости мембран и, как следствие, к повышению устойчивости растения к неспецифическому патогену. Мутанты *A. thaliana* с нуль-мутацией гена *Atcyp710a1* имели повышенную чувствительность к бактериальным патогенам [5, 7].

Как отмечалось выше, баланс между 24-метил- и этилстеринами специфичен для отдельного вида растения, органа и ткани. Предполагается, что изменение состава и соотношения различных типов стерина является ключевым звеном регуляции многих клеточных процессов [15]. В частности, соотношение 24-метил- и этилстерина определяется активностью ферментов С24-стерин метилтрансфераз, которые катализируют реакцию метилирования 24 атома углерода боковой цепи стерина. Соотношение  $\beta$ -ситостерина и стигмастерина, в свою очередь, определяется активностью С22-стерин десатуразы. Можно полагать, что количественные и качественные изменения стерина при действии фитогормонов обусловлены изменениями на уровне транскриптов. Анализ относительного содержания транскриптов *TaSMT1* и *TaSMT2* при действии АБК не выявил изменений как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы (рис. 3). Возможно, имеющегося пула транскриптов данных генов было достаточно, однако анализ уровня транскриптов *TaCYP710A8-3A* показал его значительное повышение в корнях (рис. 4а). Действие МеЖ в корнях индуцировало повышение уровня транскриптов только одного гена *TaCYP710A8-3A* (рис. 4а). Значительное повышение уровня транскриптов пяти исследованных генов биосинтеза стерина было выявлено в листьях (рис. 3, 4). Эти данные согласуются с увеличением количественного содержания стерина в листьях. При действии СК в корнях наблюдалось незначительное повышение уровня транскриптов только одного гена, *TaSMT2* (рис. 3в). В листьях, напротив, уровень транскриптов всех исследуемых ге-

нов *TaSMT1*, *TaSMT2* и *TaCYP710A8* повышался (рис. 3, 4), что также согласуется с повышением содержания стерина в листьях (табл. 1). Сложно говорить о прямой связи между активацией генов и увеличением продукта, поскольку биосинтез любого продукта является многофакторным процессом. В работе Wentzinger с соавт. [26] показано, что ингибирование ферментов сквален синтазы (SQS) и сквален эпоксидазы (SQE) в клетках табака сопровождалось повышением активности HMGR и снижением содержания стерина. Анализ экспрессии генов *GmSMT2* в сое выявил, что биотические и абиотические факторы, в том числе обезвоживание, холод и АБК, индуцировали экспрессию этих генов в ходе роста проростков [27]. Анализ уровня транскриптов другого гена изопреноидного пути показал, что мРНК гена *BfSQS1* у *Bupleurum falcatum* L. накапливается повсеместно в органах растений и заметно увеличивается в корнях после обработки МеЖ и АБК [28]. Обнаружено влияние МеЖ в качестве элиситора на уровни экспрессии генов, участвующих в изопреноидном пути метаболизма тритерпенов, таких как *CaSQS* (*Centella asiatica*), *CabAS* (*C. asiatica*  $\beta$ -амирин синтаза) и *CaCAS*, в культивируемых клетках центеллы [29, 30].

Транскрипционная регуляция играет важную роль в активации или подавлении экспрессии генов и в значительной степени контролируется промоторными областями генов с помощью *цис*-элементов [11]. Секвенирование и анализ промоторных областей гомеологичных генов *TaSMT1*, проведенный нами ранее, показал наличие и АБК- и МеЖ- и СК- и элиситор-чувствительных элементов [6]. Можно предположить, что действие фитогормонов на относительное содержание транскриптов генов стеринового биосинтеза различалось в зависимости от наличия того или иного *цис*-элемента.

Таким образом, нами выявлены изменения тритерпенового и стеринового компонента в проростках пшеницы при действии стрессовых фитогормонов. Полученные данные способствуют расшифровке регуляторных функций мембранных стерина растений.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН, а также при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-00988 (для А.Г. Ренковой и Ю.Н. Валитовой), гранта Президента РФ МК-264.2020.4 (для А.Г. Ренковой) и частично Программы Повышения Конкуренентоспособности КФУ (для Ф.В. Минибаевой).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P., Osbourn A.* Triterpene biosynthesis in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. V. 65. P. 225. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
2. *Benveniste P.* Biosynthesis and accumulation of sterols // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. V. 55. P. 429. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141616>
3. *Schaller H.* The role of sterols in plant growth and development // *Prog. Lipid Res.* 2003. V. 42. P. 163. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00047-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00047-4)
4. *Schaeffer A., Bronner R., Benveniste P., Schaller H.* The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2:1 // *Plant J.* 2001. V. 25. P. 605. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00994.x>
5. *Griebel T., Zeier J.* A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions // *Plant J.* 2010. V. 63. P. 254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04235.x>
6. *Renkova A., Valitova J., Schaller H., Minibayeva F.* The homoeologous genes encoding C24-sterol methyltransferase 1 in *Triticum aestivum*: structural characteristics and effects of cold stress // *Biologia Plantarum.* 2019. V. 63. P. 59. <https://doi.org/10.32615/bp.2019.008>
7. *Wang K., Senthil-Kumar M., Ryu C.M., Kang L., Mysore K.S.* Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 1789. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189217>
8. *Senthil-Kumar M., Wang K., Mysore K.S.* AtCYP710A1 gene-mediated stigmasterol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Signal. Behav.* 2013. V. 8. P. e23142-1. <https://doi.org/10.4161/psb.23142>
9. *Finkelstein R.R., Gampala S.S.L., Rock C.D.* Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings // *Plant Cell.* 2002. V. 14 (Suppl). P. s15. <https://doi.org/10.1105/tpc.010441>
10. *Beckers G.J., Spoel S.H.* Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate // *Plant Biol. (Stuttg.)* V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.1055/s-2005-872705>
11. *Zou C., Sun K., Mackaluso J.D., Seddon A.E., Jin R., Thomashow M.F., Shiu S.H.* Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 14992. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103202108>
12. *McLafferty F.W., Stauffer D.A., Loh S.Y., Wesdemiotis C.* Unknown identification using reference mass spectra. Quality evaluation of databases // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999. V. 10. P. 1229. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(99\)00104-X](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00104-X)
13. *Paolacci A.R., Tanzarella O.A., Porceddu E., Ciaffi M.* Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat // *BMC Mol. Biol.* 2009. V. 10. P. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-11>
14. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods.* 2001. V. 25. P. 402. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
15. *Dufourc E.J.* The role of phytosterols in plant adaptation to temperature // *Plant Signal. Behav.* 2008. V. 3. P. 133. <https://doi.org/10.4161/psb.3.2.5051>
16. *Tang J., Ohyama K., Kawaura K., Hashinokuchi H., Kamiya Y., Suzuki M., Muranaka T., Ogihara Y.* A new insight into application for barley chromosome addition lines of common wheat: achievement of stigmasterol accumulation // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 1555. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183533>
17. *Stillwell W., Cheng Y.F., Wassall S.R.* Plant sterol inhibition of abscisic acid-induced perturbations in phospholipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. V. 1024. P. 345. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90364-t](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90364-t)
18. *Mansouri H., Asrar Z.* Effects of abscisic acid on content and biosynthesis of terpenoids in *Cannabis sativa* at vegetative stage // *Biologia Plantarum.* 2012. V. 56. P. 153. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0033-2>
19. *Rossato L., MacDuff J.H., Laine P., Le Deunff E., Ourry A.* Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1131. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1131>
20. *Martin D., Tholl D., Gershenzon J., Bohlmann J.* Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 1003. <https://doi.org/10.1104/pp.011001>
21. *Manivannan A., Soundararajan P., Park Y.G., Jeong B.R.* Chemical elicitor-induced modulation and antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. P. 399. <https://doi.org/10.3390/ijms17030399>
22. *Suzuki H., Reddy M.S., Naoumkina M., Aziz N., May G.D., Huhman D.V., Sumner L.W., Blount J.W., Mendes P., Dixon R.A.* Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula* // *Planta.* 2005. V. 220. P. 696. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1387-2>
23. *Awate P.D., Gaikwad D.K.* Influence of growth regulators on secondary metabolites of medicinally important oil yielding plant *Simarouba glauca* DC. under water stress conditions // *J. Stress Physiol. Biochem.* 2014. V. 10. P. 222.
24. *Valitova J., Renkova A., Mukhitova F., Dmitrieva S., Minibayeva F.* Membrane sterols and genes of sterol biosynthesis are involved in the response of *Triticum aestivum* seedlings to cold stress // *Plant Physiol. Biochem.* 2019. V. 142. P. 452. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.026>
25. *Aboobucker S.I., Suza W.P.* Why Do Plants Convert Sitosterol to Stigmasterol? // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 354. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00354>

26. *Wentzinger L.F., Bach T.J., Hartmann M.A.* Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 334.  
<https://doi.org/10.1104/pp.004655>
27. *Neelakandan A.K., Nguyen T.M., Kumar R., Tran L.S., Guttikonda S.K., Quach T.N., Aldrich D.L., Nes W.D., Nguyen H.T.* Molecular characterization and functional analysis of *Glycine max* sterol methyl transferase 2 genes involved in plant membrane sterol biosynthesis // *Plant Mol. Biol.* 2010. V. 74. P. 503.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-010-9692-6>
28. *Kim Y.S., Cho J.H., Park S., Han J.Y., Back K., Choi Y.E.* Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum* // *Planta.* 2011. V. 233. P. 343.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-010-1292-9>
29. *Kim O.K., Kim M.Y., Hwang S.J., Ahn J.C., Hwang B.* Cloning and molecular analysis of cDNA encoding cycloartenol synthase from *Centella asiatica* (L.) Urban // *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2005. V. 10. P. 16.  
<https://doi.org/10.1007/BF02931177>
30. *Mangas S., Bonfill M., Osuna L., Moyano E., Tortoriello J., Cusido R.M., Piñol M.T., Palazón J.* The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants // *Phytochemistry.* 2006. V. 67. P. 2041.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.025>