

УДК 581.1

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИНВЕРТАЗ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ *Nicotiana tabacum* L. И *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.) К ГИПОТЕРМИИ

© 2021 г. В. Н. Попов<sup>а</sup>, \*, Н. В. Астахова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: vnpopov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.12.2020 г.

После доработки 30.12.2020 г.

Принята к публикации 01.01.2021 г.

Исследовали изменение активности инвертаз при закаливании теплолюбивых растений *Nicotiana tabacum* L. и холодостойких – *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.) к гипотермии. Показано, что при закаливании у табака наблюдалось 20% снижение активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз и почти двукратное увеличение активности инвертазы клеточной стенки. У арабидопсиса за время закаливания происходило более чем двукратное увеличение активности всех трех типов инвертаз. В процессе закаливания у табака наблюдался 20% рост содержания сахаров. При этом доли сахарозы и гексоз (фруктоза и глюкоза) как до, так и после закаливания были равными и составляли примерно по 50%. В растениях арабидопсиса за время закаливания содержание сахаров возрастало в 2.5 раза, при этом происходило уменьшение доли сахарозы в общей массе сахаров (с 44 до 24%) и увеличение доли гексоз (с 56 до 76%). Сделано предположение, что повышение активности инвертазы клеточной стенки у обоих видов исследуемых растений тормозило отток ассимилятов и создавало предпосылки для накопления продуктов фотосинтеза в клетках мезофилла листа у растений табака и арабидопсиса. Снижение активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз у *N. tabacum* ограничивало образование гексоз в клетках и снижало эффективность закаливания растений табака. Более чем двукратный рост содержания растворимых углеводов у арабидопсиса достигался, главным образом, за счет накопления гексоз, в результате повышения активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз, что обеспечивало высокую эффективность закаливания *A. thaliana* к гипотермии.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum* L., *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.), гипотермия, закаливание, фотосинтез, сахара, инвертазы

DOI: 10.31857/S0015330321050146

### ВВЕДЕНИЕ

Гипотермия является одним из наиболее распространенных экологических факторов, влияющих на метаболизм растений и определяющих их продуктивность и географическое распространение на планете. Растения способны существенно повышать устойчивость к повреждающему действию холода и мороза в процессе закаливания, которое происходит при экспозиции растений в условиях низких, но не повреждающих температур [1].

Накопление сахаров при гипотермии – одна из наиболее хорошо изученных защитных реакций растений, которая реализуется в процессе закаливания [2]. Сахароза, глюкоза и фруктоза служат основным источником энергии и предшественниками при синтезе других веществ с защитным эффектом, выполняют осморегуляторную, крио-

протекторную, антиоксидантную и сигнальную функции [3].

Реализация защитных свойств сахаров при гипотермии во многом зависит от активности гидролитического фермента инвертазы ( $\beta$ -фруктофуранозидаса, КФ 3.2.1.26), которая расщепляет основную транспортную форму сахаров – сахарозу – на глюкозу и фруктозу [4]. В растениях имеется три типа инвертаз, различающихся по субклеточной локализации, растворимости и рН оптимуму. Локализованная в клеточной стенке и связанная с ней ионными связями инвертаза, а также растворимая вакуолярная форма фермента, проявляют максимальную активность при рН от 4.5 до 5.0. Растворимая инвертаза, локализованная в цитоплазме растительной клетки, имеет рН оптимум в области 7.0–7.8 [4].

В литературе имеются многочисленные и довольно разнообразные данные, касающиеся изменения активности инвертаз в условиях низких

**Сокращения:** ФС II – фотосистема II, НХК1 – гексокиназа 1.

температур. Как правило, участие инвертаз в закаливании растений к гипотермии связывают с мобилизацией растворимых углеводов, необходимых для формирования повышенной холодоустойчивости. Так, в работе [5] было показано, что двукратное увеличение активности инвертазы клеточной стенки при закаливании *Solanum tuberosum* L. приводило к существенному росту содержания сахаров внутриклеточной и апопластной локализации и к повышению устойчивости растений картофеля к гипотермии. Растения арабидопсиса, трансформированные геном *CsINV5* вакуолярной инвертазы из *Camellia sinensis* L., отличались от контрольных растений измененным соотношением сахара/гексозы, увеличенным содержанием гексоз и повышенной устойчивостью к гипотермии [6].

Показано участие вакуолярной инвертазы в стабилизации фотосинтеза у растений *A. thaliana* в условиях низких температур [7]. Авторы этой работы установили, что имеющие пониженную активность вакуолярной инвертазы мутанты арабидопсиса *inv4*, отличались от растений дикого типа более низкими значениями максимального квантового выхода ФС II и скорости ассимиляции CO<sub>2</sub> при гипотермии. При этом увеличение активности цитоплазматической инвертазы не могло компенсировать дефицит активности вакуолярной инвертазы [7].

Имеются данные о вовлечении инвертаз в процесс защиты растений от окислительного стресса. Так, мутанты *A. thaliana* по генам, кодирующим цитоплазматическую инвертазу, характеризовались повышенным уровнем экспрессии генов, участвующих в защите от окислительного стресса [8]. В другой работе показано, что растения *S. tuberosum*, трансформированные геном инвертазы дрожжей апопластной локализации, в условиях гипотермии имели повышенное содержание сахаров и значительно меньшую интенсивность перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансформированными растениями [9].

Помимо работ, описывающих существенный вклад инвертаз в закалывание растений к гипотермии, имеются публикации, в которых авторы отрицают участие инвертаз в этом процессе. Так, было показано значительное снижение активности вакуолярной инвертазы в процессе закалывания *Brassica oleracea* L. При этом содержание сахаров, особенно глюкозы и фруктозы, в листьях капусты возрастало в 3–4 раза. На основе этих данных авторы сделали вывод о том, что вакуолярная инвертаза не играет существенной роли в аккумуляции сахаров и в формировании устойчивости растений капусты к низким температурам [10].

Таким образом, представленные в литературе данные об участии инвертаз в закаливании растений

к гипотермии сильно различаются в зависимости от видовой специфики исследуемых растений и условий проведения экспериментов. Кроме того, значительное число публикаций не содержит данных об активности всех типов инвертаз имеющих в клетке, что затрудняет анализ роли этих ферментов в формировании устойчивости к гипотермии.

Цель работы – исследование изменения активности вакуолярной, цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой инвертаз у теплолюбивых (*Nicotiana tabacum* L.) и холодостойких (*Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.)) растений в связи с особенностями аккумуляции растворимых углеводов при закаливании этих растений к гипотермии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** Объектами исследования являлись теплолюбивые растения табака (*Nicotiana tabacum* L., сортотип Samsun) и холодостойкие растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.), экотип Columbia). Растения выращивали в вазонах с почвой в камерах фитотрона ИФР РАН при следующих условиях: табак – температура 22°C, 16-часовой фотопериод и освещенность 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), арабидопсис – температура 22°C, 8-часовой фотопериод и освещенность 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с). Выбор 8-часового режима светового дня для арабидопсиса обусловлен тем, что он относится к длиннодневным растениям и при использовании короткого дня достигает необходимой для исследований биомассы розетки, не переходя в фазу цветения. Для опытов использовали растения в возрасте шести недель. Закалывание растений проводили в климатической камере KBW – 240 (“Binder”, Германия) в течение 5 сут при температуре 8°C для табака и 2°C для арабидопсиса, оставляя другие условия выращивания без изменений. Данные режимы закалывания были подобраны в ходе предварительных опытов. В качестве контроля использовали растения, не подвергнутые воздействию закалывающей температуры.

**Устойчивость растений к гипотермии.** Для оценки устойчивости *N. tabacum* и *A. thaliana* к низким температурам незакаленные и закаленные растения обоих видов тестировали в климатической камере MIR–153 (“Sanyo”, Япония) в течение 1 сут при температурах от –1 до –4°C для табака и при температурах от –1 до –8°C для арабидопсиса. После промораживания растения переносили в оптимальные для вегетации условия на одну неделю. Выживаемость растений рассчитывали как количество выживших растений в % от общего

количества растений подвергнутых тестированию при каждой температуре.

**Определение содержания сахаров.** Навески листьев *N. tabacum* и *A. thaliana* (~500 мг) фиксировали 96% кипящим этанолом. Ткань растирали в фарфоровой ступке и сахара извлекали трехкратной экстракцией 80% этанолом. В полученных экстрактах определяли содержание глюкозы – глюкозооксидазным методом, сахарозы и фруктозы – по методу Рое [11]. Полученные результаты выражали в мг/г сухой массы.

**CO<sub>2</sub>-газообмен растений.** Изучение CO<sub>2</sub>-газообмена растений *N. tabacum* и *A. thaliana* проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (Германия) при 22°C (контроль), 8°C (закаленные растения табака) и 2°C (закаленные растения арабидопсиса), т.е. при температурах, идентичных температурам вегетации и холодового закаливания. Измерения газообмена включали определение скорости видимой ассимиляции CO<sub>2</sub> и темнового дыхания, которые выражали в мг CO<sub>2</sub>/(г сухой массы ч). На основе этих параметров рассчитывали отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание [12].

**Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры хлоропластов.** Для получения препаратов для микроскопии использовали фрагменты из срединной части хорошо развитых листьев *N. tabacum* и *A. thaliana*. Растительный материал фиксировали в течение 4 ч 2.5% глутаровым альдегидом в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) при температуре 4°C. После 4-кратной промывки фосфатным буфером материал фиксировали 1% раствором OsO<sub>4</sub>, обезвоживали последовательно растворами этанола в возрастающих концентрациях и ацетоном, а затем заливали в Epon – 812. Ультратонкие срезы листьев растений получали на ультрамикротоме LKB3 (“LKB”, Швеция). Срезы просматривали при помощи электронного микроскопа LIBRA120 (“ZEISS”, Германия) при увеличении ×4000. Измерение площади крахмальных зерен в хлоропластах проводили при помощи встроенного программного обеспечения электронного микроскопа LIBRA120 (“ZEISS”, Германия), при этом просматривали не менее 100 хлоропластов каждого варианта [13].

**Определение активности инвертаз.** Навески листьев *N. tabacum* и *A. thaliana* (по 1 г) растирали в фарфоровой ступке на холоде в фосфатно-цитратной буферной смеси рН 7.0, состоящей из 0.1 М лимонной кислоты и 0.2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Полученный гомогенат для удаления сахаров, содержащихся в тканях, диализовали 20 ч при температуре 4°C против разбавленной в 10 раз фосфатно-цитратной буферной смеси. Затем гомогенат центрифугировали 20 мин при 18600 g при помощи цен-

трифуги K24D (“MLW”, Германия). Супернатант использовали для определения активности растворимых вакуолярной и цитоплазматической инвертаз. Осадок трижды промывали разбавленным буфером, центрифугируя суспензию каждый раз при 200 g и получая фракцию клеточных стенок, которую использовали для определения активности инвертазы клеточной стенки. Инкубационная смесь общим объемом 0.5 мл содержала 0.2 мл фракции фермента, 0.3 мл буфера с сахарозой, конечная концентрация которой в смеси составляла 150 мМ. Для определения активности кислых инвертаз (вакуолярная инвертаза и инвертаза клеточной стенки) использовали 1 М ацетатный буфер (рН 4.7), для щелочной (цитоплазматическая инвертаза) – фосфатно-цитратную буферную смесь (рН 7.5). Время инкубации составляло 1 ч, при температуре 30°C. Об активности фермента судили по количеству образовавшейся в инкубационной среде глюкозы, которую определяли глюкозооксидазным методом [14].

Во всех экспериментах биологическая повторность измерений была 6-кратной, аналитическая 3–4-кратной. Каждый эксперимент повторяли не менее 3–4 раз. Результаты экспериментов обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На гистограммах представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями оценена по *t*-критерию Стьюдента для 95% уровня значимости ( $P < 0.05$ ). Достоверно различающиеся между собой величины обозначены разными надстрочными буквами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Устойчивость растений N. tabacum и A. thaliana к гипотермии*

Об устойчивости исследуемых растений к гипотермии судили по их выживаемости после промораживания при различных температурах. Из данных представленных в табл. 1 видно, что незакаленные растения табака после промораживания при температуре –1°C полностью сохраняли свою жизнеспособность. При снижении температуры до –2°C выживаемость *N. tabacum* составляла 57%, а после –3°C все незакаленные растения погибли. Закаленные растения табака успешно выдерживали температуру –2°C (выживаемость 100%). При температуре –3°C выживало 65% растений, а при –4°C все растения погибли.

Все незакаленные растения арабидопсиса выжили при температурах промораживания вплоть до –3°C. При температуре –4°C выживаемость снижалась почти в 2 раза (до 55%), а при –5°C падала до нуля. После закаливания растения арабидопсиса демонстрировали 100% выживаемость при темпе-

**Таблица 1.** Выживаемость (%) незакаленных и закаленных растений табака и арабидопсиса после промораживания в течение 1 сут

Температура промораживания	Выживаемость, %			
	<i>Nicotiana tabacum</i> L.		<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynh. (L.)	
	незакаленные растения	закаленные растения	незакаленные растения	закаленные растения
-1°C	100	100	100	100
-2°C	57 ± 9	100	100	100
-3°C	0	65 ± 8	100	100
-4°C	0	0	55 ± 5	100
-5°C	0	0	0	100
-6°C	0	0	0	100
-7°C	0	0	0	45 ± 6
-8°C	0	0	0	0

**Таблица 2.** Изменение содержания сахаров в листьях растений табака и арабидопсиса при закаливании к гипотермии

Вариант опыта	Содержание сахаров, мг/г сухой массы			
	фруктоза	глюкоза	сахароза	сумма сахаров
<i>Nicotiana tabacum</i> L.				
Незакаленные растения	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	15.5 ± 0.8 <sup>a</sup>
Закаленные растения	2.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	7.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	9.7 ± 0.5 <sup>b</sup>	19.6 ± 0.9 <sup>b</sup>
<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynh. (L.)				
Незакаленные растения	1.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	10.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	23.7 ± 1.7 <sup>c</sup>
Закаленные растения	4.9 ± 0.5 <sup>c</sup>	41.1 ± 2.2 <sup>d</sup>	14.3 ± 0.5 <sup>c</sup>	60.3 ± 3.4 <sup>d</sup>

Примечание. В каждом столбце величины, достоверно различающиеся при  $P < 0.05$ , обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

ратурах до -6°C. Промораживание при -7°C вызывало снижение выживаемости *A. thaliana* до 45%, а при -8°C – до нуля.

*Содержание сахаров в растениях  
N. tabacum u A. thaliana*

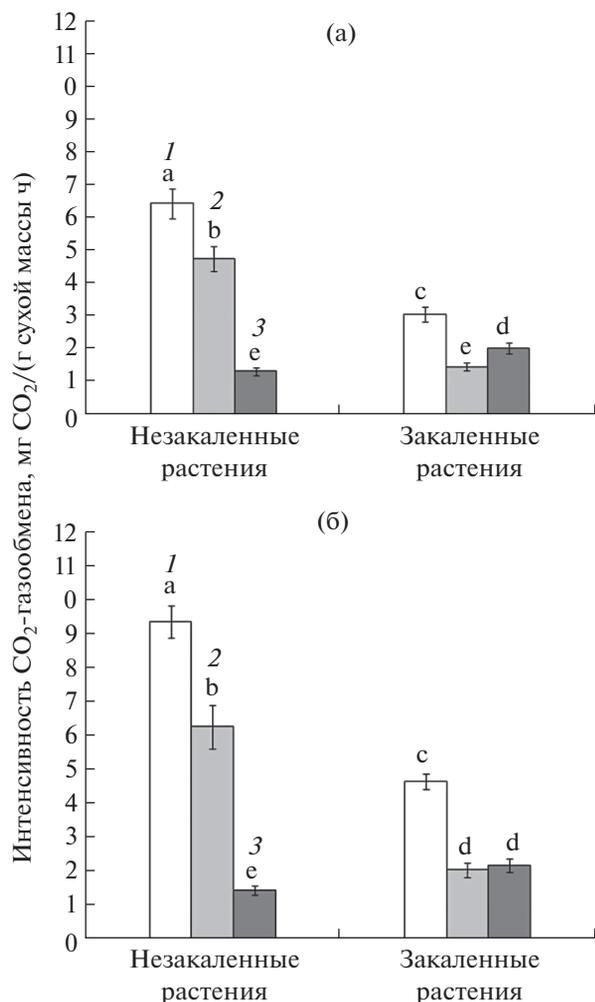
Данные по изменению содержания сахаров в листьях растений табака и арабидопсиса при низкотемпературном закаливании представлены в табл. 2. В процессе закаливания у табака происходил ~20% рост содержания сахаров (с 15.5 до 19.6 мг/г сухой массы), который достигался за счет почти равномерного увеличения содержания фруктозы, глюкозы и сахарозы. При этом соотношение разных форм сахаров за время низкотемпературного закаливания практически не изменялось (табл. 3). Доли сахарозы и гексоз (фруктоза и

глюкоза) как до, так и после закаливания были равными и составляли примерно по 50%.

В растениях арабидопсиса за время закаливания суммарное содержание сахаров возрастало в 2.5 раза (с 23.7 до 60.3 мг/г сухой массы). Такой результат был получен за счет увеличения содержания сахарозы почти на 40%, а фруктозы и глюкозы – в 3.5 раза. При закаливании *A. thaliana* значительно изменялось соотношение разных форм сахаров в сторону уменьшения доли сахарозы в общей массе сахаров (с 44 до 24%) и увеличения доли гексоз (с 56 до 76%).

*CO<sub>2</sub>-газообмен растений N. tabacum u A. thaliana*

В ходе проведенных экспериментов было установлено, что у обоих видов исследуемых растений, параметры CO<sub>2</sub>-газообмена в процессе закаливания



**Рис. 1.** Изменение параметров  $\text{CO}_2$ -газообмена растений табака (а) и арабидопсиса (б) при закаливании к гипотермии (1 – видимый фотосинтез, 2 – темновое дыхание, 3 – отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание). Достоверные различия средних значений при  $P < 0.05$  отмечены разными латинскими буквами над барами.

ливания к гипотермии изменялись практически одинаково (рис. 1а, б). Интенсивность видимого фотосинтеза снижалась в 2 раза: с 6.5 до 3.1 мг  $\text{CO}_2/\text{г}$  сухой массы ч у табака, и с 9.4 до 4.7 мг  $\text{CO}_2/\text{г}$  сухой массы ч у арабидопсиса. Интенсивность темнового дыхания уменьшалась примерно в 3 раза: с 4.8 до 1.5 мг  $\text{CO}_2/\text{г}$  сухой массы ч у табака, и с 6.3 до 2.1 мг  $\text{CO}_2/\text{г}$  сухой массы ч у арабидопсиса. Такие изменения  $\text{CO}_2$ -газообмена приводили к 1.5-кратному росту отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание у обоих видов.

#### Площадь крахмальных зерен в хлоропластах *N. tabacum* и *A. thaliana*

Электронно-микроскопические наблюдения показали, что в процессе закаливания *N. tabacum* и *A. thaliana* наблюдались существенные изменения как площади, так и количества крахмальных зерен в хлоропластах (рис. 2, 3). У табака площадь одного крахмального зерна и суммарная площадь крахмальных зерен в хлоропласте увеличивалась более чем в 2 раза (табл. 4). В результате таких изменений доля крахмальных зерен от площади хлоропласта возрастала с 24 до 46%.

У арабидопсиса, в отличие от табака, площадь одного крахмального зерна за время закаливания не изменялась, но за счет увеличения количества крахмальных зерен (рис. 3), суммарная площадь крахмальных зерен в хлоропласте возрастала почти на 25% (табл. 4). Это приводило к увеличению доли крахмальных зерен, рассчитанной от площади среза хлоропласта с 12 до 16%.

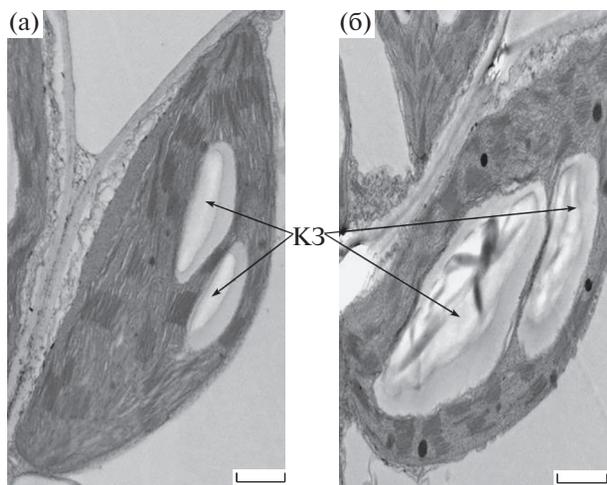
#### Активность инвертаз в растениях *N. tabacum* и *A. thaliana*

Данные по изменению активности инвертаз в листьях растений табака и арабидопсиса при низ-

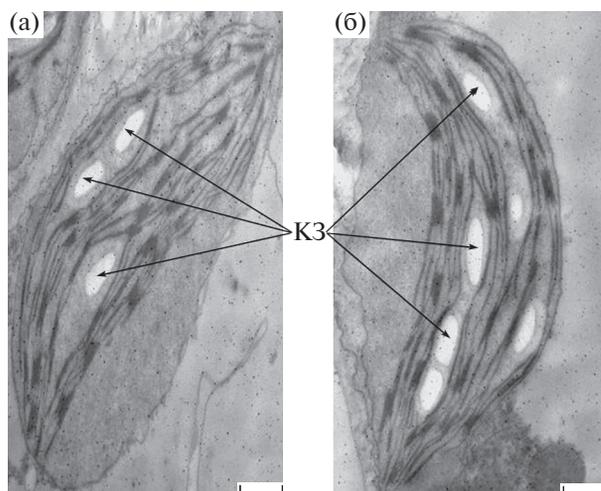
**Таблица 3.** Изменение соотношения разных форм сахаров в листьях растений табака и арабидопсиса при закаливании к гипотермии

Вариант опыта	Содержание сахаров, % от суммы сахаров			
	фруктоза	глюкоза	сумма гексоз	сахароза
<i>Nicotiana tabacum</i> L.				
Незакаленные растения	12 ± 1 <sup>a</sup>	37 ± 3 <sup>a</sup>	49 ± 4 <sup>a</sup>	51 ± 3 <sup>a</sup>
Закаленные растения	12 ± 1 <sup>a</sup>	38 ± 2 <sup>a</sup>	50 ± 4 <sup>a</sup>	50 ± 3 <sup>a</sup>
<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynh. (L.)				
Незакаленные растения	6 ± 1 <sup>b</sup>	50 ± 4 <sup>b</sup>	56 ± 5 <sup>a</sup>	44 ± 3 <sup>a</sup>
Закаленные растения	8 ± 1 <sup>b</sup>	68 ± 4 <sup>c</sup>	76 ± 5 <sup>b</sup>	24 ± 1 <sup>b</sup>

Примечание. В каждом столбце величины, достоверно различающиеся при  $P < 0.05$ , обозначены разными надстрочными латинскими буквами.



**Рис. 2.** Изменение площади и количества крахмальных зерен в хлоропластах растений табака при закаливании к гипотермии (а – незакаленные растения, б – закаленные растения). КЗ – крахмальное зерно. Масштабная шкала – 1 мкм.



**Рис. 3.** Изменение площади и количества крахмальных зерен в хлоропластах растений арабидопсиса при закаливании к гипотермии (а – незакаленные растения, б – закаленные растения). КЗ – крахмальное зерно. Масштабная шкала – 1 мкм.

коте температурном закаливании представлены на рисунке 4. В процессе закаливания у табака наблюдалось ~20% снижение активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз и почти двукратное увеличение активности инвертазы клеточной стенки (рис. 4а).

В листьях арабидопсиса за время закаливания к гипотермии происходило более чем двукратное увеличение активности всех трех типов инвертаз (рис. 4б).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

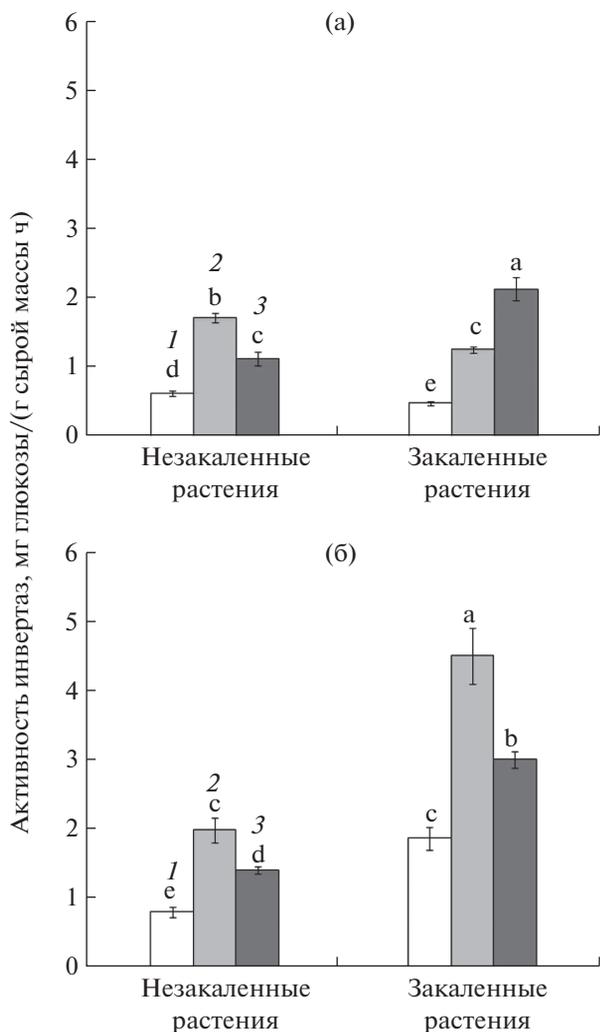
Закаливание растений приводит к формированию повышенной устойчивости к гипотермии, позволяющей растениям выдерживать более низ-

кие повреждающие температуры по сравнению с незакаленными растениями [15]. Одним из наиболее часто используемых методов, позволяющих достоверно оценить эффективность закаливания, является метод прямого промораживания целых растений с последующей оценкой их выживаемости [16]. Полученные нами данные показали, что растения *N. tabacum* и *A. thaliana* в результате закаливания повышали свою устойчивость к отрицательным температурам, хотя и в разной степени. Если судить по температуре выживания всех тестируемых растений (выживаемость 100%), то можно констатировать, что в результате закаливания растения табака повышали свою устойчивость к морозу на 1°С (с –1 до –2°С). Эффективность закаливания *A. thaliana* оказалась значительно выше. Закален-

**Таблица 4.** Изменение площади крахмальных зерен в хлоропластах растений табака и арабидопсиса при закаливании к гипотермии

Измеряемый параметр	<i>Nicotiana tabacum</i> L.		<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynh. (L.)	
	незакаленные растения	закаленные растения	незакаленные растения	закаленные растения
Площадь одного крахмального зерна, мкм <sup>2</sup>	1.20 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.40 ± 0.07 <sup>c</sup>
Суммарная площадь крахмальных зерен в хлоропласте, мкм <sup>2</sup>	3.13 ± 0.26 <sup>a</sup>	8.23 ± 0.40 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.12 ± 0.08 <sup>d</sup>
Доля крахмальных зерен от площади среза хлоропласта, %	24 ± 2 <sup>a</sup>	46 ± 3 <sup>b</sup>	12 ± 1.6 <sup>c</sup>	16 ± 1.2 <sup>d</sup>

Примечание. Надстрочные латинские буквы обозначают достоверность различий средних значений при *P* < 0.05 по каждому показателю, представленному в таблице.



**Рис. 4.** Изменение активности инвертаз в листьях растений табака (а) и арабидопсиса (б) при закаливании к гипотермии (1 – цитоплазматическая инвертаза, 2 – вакуолярная инвертаза, 3 – инвертаза клеточной стенки). Достоверные различия средних значений при  $P < 0.05$  отмечены разными латинскими буквами над барами.

ные растения арабидопсиса повышали свою морозоустойчивость на  $3^{\circ}\text{C}$  (с  $-3$  до  $-6^{\circ}\text{C}$ ).

Известно, что причиной повреждения и гибели растений при отрицательных температурах является образование льда в их тканях. Образование кристаллов льда внутри клетки всегда приводит к ее гибели. Внеклеточное образование льда позволяет предотвратить механические внутриклеточные повреждения и сохранить жизнеспособность клеток растений [17]. Поэтому стратегия адаптации растений к морозу основана на образовании льда в межклетниках и избегании возникновения льда внутри клетки [2].

В реализации этой стратегии существенная роль принадлежит растворимым углеводам, которые на-

капливаются в растениях в период низкотемпературного закаливания [18]. Проведенные нами эксперименты выявили значительные различия между *N. tabacum* и *A. thaliana* по их способности к накоплению сахаров при закалывающих температурах. У растений табака содержание сахаров в листьях увеличилось лишь на 20%, а у арабидопсиса – в 2.5 раза по сравнению с незакаленными растениями. Эти результаты хорошо согласуются с данными по устойчивости растений табака и арабидопсиса к отрицательным температурам (табл. 1) и могут объяснять большие различия в эффективности закаливания между *N. tabacum* и *A. thaliana*.

Возможность накопления сахаров в клетке при закалывающих температурах во многом зависит от соотношения интенсивности процессов фотосинтеза (донор ассимилятов) и дыхания (акцептор ассимилятов) [12]. Наши эксперименты показали, что у обоих исследуемых видов растений интенсивность видимого фотосинтеза в процессе закаливания снижалась в меньшей степени, чем интенсивность темнового дыхания, что приводило к 1.5-кратному росту отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание. Одинаковые изменения параметров  $\text{CO}_2$ -газообмена не давали возможности объяснить большие различия в содержании растворимых сахаров у *N. tabacum* и *A. thaliana* с точки зрения соотношения процессов фотосинтеза и дыхания.

В литературе имеются данные о том, что деградация крахмальных зерен в хлоропластах может служить в качестве дополнительного источника сахаров при низкотемпературном закаливании [19]. Для проверки этого предположения мы определили площадь крахмальных зерен в хлоропластах, используя методы электронной микроскопии. Оказалось, что площадь крахмальных зерен у *N. tabacum* и *A. thaliana* не только не сокращалась за время закаливания, а наоборот, увеличивалась. При этом у арабидопсиса рост суммарной площади крахмальных зерен в хлоропласте ограничивался 25%, а доля крахмальных зерен не превышала 16% от площади среза хлоропласта. У табака синтез крахмала при закалывающих температурах происходил настолько интенсивно, что площадь крахмальных зерен достигала почти половины от площади среза хлоропласта (табл. 4). Таким образом, *N. tabacum* и *A. thaliana* существенно отличались по характеру накопления фотоассимилятов при закаливании к гипотермии. Можно предположить, что растения табака аккумулялировали большую часть продуктов фотосинтеза в виде крахмала, что ограничивало их способность к накоплению растворимых углеводов в листьях и снижало эффективность закаливания. У растений арабидопсиса, в отличие от табака, большая часть ассимилятов, по-видимому, накапливалась в виде сахаров в листьях, что со-

здавало потенциал для формирования повышенной устойчивости к отрицательным температурам.

Наряду с накоплением сахаров, закаливание к гипотермии изменяло и соотношение разных форм сахаров в листьях исследуемых растений. Если у табака доли сахарозы и гексоз как до, так и после закаливания составляли примерно по 50%, то у арабидопсиса значительно увеличивалась доля гексоз (главным образом, глюкозы) в общей массе сахаров, за счет почти двукратного сокращения доли сахарозы (табл. 3). Поскольку изменение соотношения сахарозы и гексоз зависит от активности инвертаз, осуществляющих гидролиз сахарозы в клетках [20], мы провели серию экспериментов по определению активности инвертаз до и после закаливания.

Наши исследования выявили как общие для растений табака и арабидопсиса изменения в активности инвертаз при закаливании, так и существенные различия между исследуемыми видами. К числу общих для обоих видов можно отнести реакцию инвертазы клеточной стенки на закаливание, а именно — увеличение ее активности в два раза по сравнению с незакаленными растениями. Как известно, инвертаза клеточной стенки принимает участие в регуляции загрузки флоэмы ассимилятами [21]. В зависимости от организации контактов между клетками мезофилла и флоэмы, различают симпластный и апопластный типы загрузки флоэмы ассимилятами. Виды растений, имеющие единый для мезофилла и флоэмы симпласт и транспортирующие ассимиляты по межклеточной сети плазмодесм, называют симпластными. Виды с разобщенными симпластными доменами мезофилла и флоэмы, использующие апопласт в качестве промежуточного накопителя ассимилятов перед их загрузкой во флоэму, относят к апопластным [22]. Для растений *N. tabacum* и *A. thaliana*, имеющих апопластный тип загрузки флоэмы [23], активность инвертазы клеточной стенки в апопласте имеет большое значение в регуляции процесса оттока ассимилятов из листьев в корни. Можно предположить, что повышение активности инвертазы клеточной стенки приводило к ускорению расщепления сахарозы в апопласте и, тем самым, к торможению загрузки флоэмы у закаленных растений табака и арабидопсиса. Образовавшиеся в процессе гидролиза сахарозы гексозы поступали обратно в клетки мезофилла, увеличивая содержание сахаров в листьях [24].

Основные различия в активности инвертаз между *N. tabacum* и *A. thaliana* были связаны с функционированием внутриклеточных инвертаз. За время закаливания к гипотермии в клетках табака и арабидопсиса происходили разнонаправленные изменения активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз, которые могли

определять особенности накопления сахаров в листьях исследуемых видов. В наших экспериментах наблюдалось ~20% снижение у табака и двукратное увеличение активности данных инвертаз у арабидопсиса. Снижение активности внутриклеточных инвертаз у *N. tabacum* ограничивало образование гексоз в клетках, поэтому соотношение сахарозы и гексоз за время низкотемпературного закаливания у этих растений практически не изменялось. Значительное увеличение доли гексоз одновременно со снижением доли сахарозы при закаливании *A. thaliana* можно объяснить повышением активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз. Работа инвертаз, приводящая к увеличению доли гексоз в общей массе сахаров, при закаливании имеет важное значение для формирования устойчивости растений к отрицательным температурам [25]. Образование в результате гидролиза молекулы сахарозы двух молекул (глюкозы и фруктозы) повышает осмотический потенциал клетки, что позволяет снижать температуру замерзания раствора, при которой происходит образование кристаллов льда [26].

Высокое содержание глюкозы в клетках закаленных растений *A. thaliana*, помимо осмотической и криопротекторной функции, могло иметь и сигнальную функцию. В литературе имеются данные об участии глюкозы в передаче внутриклеточных сигналов [27]. В качестве сенсора глюкозы рассматривается гексокиназа 1 (HKK1), локализованная в цитозоле, хлоропластах, митохондриях и ядре [28]. В литературе представлены данные об активации экспрессии генов *COR15B* и *LEA3* в ответ на увеличение содержания гексоз в клетках растений арабидопсиса в условиях низких температур [6, 19]. Одна из основных функций белков, кодируемых генами холодового ответа (*COR*), а также генами белков позднего эмбриогенеза (*LEA*) заключается в защите клеточных структур от дегидратации [29]. Поэтому можно предположить, что HKK1 могла воспринимать увеличение концентрации глюкозы в клетках арабидопсиса, участвовать в трансдукции глюкозного сигнала и, тем самым, активировать экспрессию генов, отвечающих за формирование устойчивости клеток к обезвоживанию, что имеет большое значение для повышения морозоустойчивости растений [30].

Таким образом, на основе полученных данных можно констатировать, что у растений *N. tabacum* и *A. thaliana* инвертазы играли существенную роль в закаливании к гипотермии. Можно предположить, что повышение активности инвертазы клеточной стенки у обоих видов исследуемых растений тормозило загрузку флоэмы и отток ассимилятов из листьев в корни. Это создавало предпосылки для накопления продуктов фотосинтеза в клетках мезофилла листа у растений таба-

ка и арабидопсиса. Снижение активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз у табака приводило к торможению гидролиза сахарозы в клетках этого растения. Низкий уровень накопления гексоз одновременно с интенсивным синтезом крахмала в хлоропластах ограничивал способность к накоплению сахаров и снижал эффективность низкотемпературного закаливания растений табака. Растения арабидопсиса, в отличие от табака, аккумулялировали большую часть ассимилятов в виде растворимых углеводов, а не крахмала в хлоропластах. Более чем двукратный рост содержания сахаров у арабидопсиса достигался, главным образом, за счет накопления гексоз, в результате повышения активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз, что обеспечивало высокую эффективность закаливания *A. thaliana* к гипотермии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания (номер темы 121040800153-1 “Механизмы адаптации растений к факторам аридизации глобального климата и антропогенному загрязнению окружающей среды”).

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Larcher W.* Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 2003. P. 513.
2. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. 54 с.
3. *Tarkowski L.P. and Van den Ende W.* Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure // *Front Plant Sci.* 2015. V. 6. Article 203. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00203>
4. *Sturm A.* Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning // *Plant Physiol.* 1999. V. 121. P. 1. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.1>
5. *Deryabin A.N., Burakhanova E.A., Trunova T.I.* Apoplastic sugars and cell wall invertase are involved in formation of the tolerance of cold-resistant potato plants to hypothermia // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2015. V. 465. P. 366.
6. *Qian W., Xiao B., Wang L., Hao X., Yue C., Cao H., Wang Y., Li N., Yu Y., Zeng J., Yang Y., Wang X.* Cs-INV5, a tea vacuolar invertase gene enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* // *BMC Plant Biology.* 2018. V. 18. Article 228. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1456-5>
7. *Weiszmann J., Furtauer L., Weckwerth W., Nagele T.* Vacuolar sucrose cleavage prevents limitation of cytosolic carbohydrate metabolism and stabilizes photosynthesis under abiotic stress // *FEBS Journal.* 2018. V. 285. P. 4082. <https://doi.org/10.1111/febs.14656>
8. *Xiang L., Le Roy K., Bolouri-Moghaddam M.R., Vanhaecke M., Lammens W., Rolland F., Van den Ende W.* Exploring the neutral invertase – oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana* // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3849. <https://doi.org/10.1093/jxb/err069>
9. *Deryabin A.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Astakhova N.V., Sabelnikova E.P., Trunova T.I.* Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature // *J. Therm Biol.* 2005. V. 30. P. 73. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.07.002>
10. *Sasaki H., Ichimura K., Imada S., Yamaki S.* Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings // *J. Plant Physiol.* 2001. V. 158. P. 847.
11. *Туркина М.В., Соколова С.В.* Методы определения моносахаридов и олигосахаридов // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука, 1971. 7 с.
12. *Климов С.В.* Холодовое закаливание растений – результат поддержания повышенного отношения фотосинтез/дыхание при низких температурах // Известия РАН. Серия биологическая. 2003. Т. 30. С. 57.
13. *Трунова Т.И., Астахова Н.В., Дерябин А.Н., Сабельникова Е.П.* Ультраструктурная организация хлоропластов листьев растений картофеля, трансформированного геном дрожжевой инвертазы, в норме и при гипотермии // Доклады АН. 2003. Т. 389. С. 842.
14. *Klimov S.V., Popov V.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Trunova T.I.* The decreased cold-resistance of chilling-sensitive plants is related to suppressed CO<sub>2</sub> assimilation in leaves and sugar accumulation in roots // *Russ. J. Plant Physiol.* 2002. V. 49. P. 776.
15. *Xin Z., Browse J.* Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures // *Plant Cell Environ.* 2000. V. 23. P. 893.
16. *Zuther E., Schulz E., Childs L.H., Hinch D.K.* Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. P. 1860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02522.x>
17. *Ashworth E.N., Pearce R.S.* Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species // *Planta.* 2002. V. 214. P. 798.
18. *Ma Y., Zhang Y., Lu J., Shao H.* Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress // *Afr. J. Biotechnol.* 2009. V. 8. P. 2004.
19. *Sicher R.* Carbon partitioning and the impact of starch deficiency on the initial response of *Arabidopsis* to chilling temperatures // *Plant Science.* 2011. V. 181. P. 167. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.005>
20. *Barau J., Grandis A., Carvalho V.M., Teixeira G.S., Zapparioli G.H.A., Scatolin do Rio M.A., Rincones J., Bucker-*

- idge M.S., Pereira G.A.G. Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches broom disease of cacao // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 1325.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru485>
21. Roitsch T., Gonzalez M.C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations // Trends Plant Sci. 2004. V. 9. P. 606.
  22. Гамалей Ю.В. Флоэма листа. СПб.: Наука, 1990. 144 с.
  23. Gamalei Y.V., Pakhomova M.V., Sjutkina A.V. Ecological aspects of assimilate export. Temperature // Fiziol. Rast. 1992. V. 39. P. 1068.
  24. Chikov V.I., Bakirova G.G. Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity // Russ. J. Plant Physiol. 2004. V. 51. P. 420.
  25. Livingston D.P., Henson C.A. Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 403.  
<https://doi.org/10.1104/pp.116.1.403>
  26. Reyes-Diaz M., Ulloa N., Zuniga-Feest A., Gutierrez A., Gidekel M., Alberdi M., Corcuera L.J., Bravo L.A. *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 3687.
  27. Gupta A.K., Kaur N. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants // J. BioSci. 2005. V. 30. P. 761.
  28. Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling // Science. 2003. V. 300. P. 332.
  29. Wilhelm K.S., Thomashow M.F. *Arabidopsis thaliana cor15b*, an apparent homologue of *cor15a*, is strongly responsive to cold and ABA, but not drought // Plant Mol. Biol. 1993. V. 23. P. 1073.
  30. Jang J.C., León P., Sheen J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 5.