

БИОЛОГИЯ
BIOLOGYУДК 577.3:577.1:631.8
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-1-46-54>Поступило в редакцию 08.12.2022
Received 08.12.2022**Н. Г. Аверина, С. М. Савина, А. В. Емельянова, И. А. Дремук, Ю. В. Прищепчик***Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь***МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ,
ФОТОСИНТЕЗА И МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ
ПШЕНИЦЫ, ОБРАБОТАННЫХ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ***(Представлено академиком И. Д. Волотовским)*

Аннотация. Установлено, что в обогащенных антоцианами coleoptiles озимой пшеницы сорта ЭтW5 экзогенная 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) в 1,5 раза увеличила содержание антоцианов и повысила уровень экспрессии структурных (*PAL*, *CHS*) и регуляторного (*PAP-1*) генов пути биосинтеза антоцианов. В coleoptiles растений сорта Влади, содержащих в 33 раза меньше количество антоцианов по сравнению с сортом ЭтW5, экспрессия *CHS* и *PAP-1* была снижена и дополнительно заингибирована с помощью АЛК. Таким образом, генетическая активность фенилпропаноидного и флавоноидного участков пути биосинтеза антоцианов показывает отчетливую сортоспецифичность и зависимость от уровня антоцианов. АЛК значительно снизила тепловую диссипацию энергии возбуждения в комплексах ФСII у обогащенного антоцианами сорта ЭтW5 и существенно повысила уровень этих процессов у сорта Влади. Отмечена сортоспецифичность в уровнях морозостойкости двух сортов – высокий (88 % выживших растений, подвергшихся действию температуры –8 °С в течение 5 ч) у сорта ЭтW5 и более низкий (80 %) у сорта Влади. АЛК повысила морозоустойчивость обоих сортов за счет увеличения содержания антоцианов и пролина в coleoptiles сорта ЭтW5 и большего содержания пролина у сорта Влади.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., coleoptili, антоцианы, пролин, 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), АЛК-дегидратаза, порфобилиногеназа, гены *PAL*, *CHS*, *PAP-1*, показатели фотосинтеза, морозоустойчивость

Для цитирования. Молекулярные механизмы регуляции биосинтеза антоцианов, фотосинтеза и морозоустойчивость проростков озимой пшеницы, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой / Н. Г. Аверина [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 1. – С. 46–54. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-1-46-54>

Natalya G. Averina, Svetlana M. Savina, Anna V. Yemelyanova, Irina A. Dremuk, Yulia V. Prischepchik*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***MOLECULAR MECHANISMS OF REGULATION OF ANTHOCYANINE BIOSYNTHESIS,
PHOTOSYNTHESIS, AND FROST RESISTANCE OF WINTER WHEAT SEEDLINGS TREATED
WITH THE 5-AMINOLEVULIC ACID***(Communicated by Academician Igor D. Volotovskiy)*

Abstract. It was found that in anthocyanin-enriched coleoptiles of winter wheat EtW5 variety, the exogenous 5-aminolevulinic acid (ALA) increased the content of anthocyanins by a factor of 1.5 and the expression level of structural (*PAL*, *CHS*) and regulatory (*PAP-1*) genes of the anthocyanin biosynthesis pathway. In coleoptiles of Vladi plants containing 33 times less anthocyanins compared to EtW5, the expression of *CHS* and *PAP-1* was reduced and additionally inhibited by ALA. Thus, the genetic activity of the phenylpropanoid and flavonoid sites of the anthocyanin biosynthesis pathway shows distinct variety specificity and a dependence on the level of anthocyanins. ALA significantly reduced the thermal dissipation of excitation energy in PSII complexes in the EtW5 variety enriched with anthocyanins and significantly increased the level of these processes in the Vladi variety. Variety-specificity was noted in the levels of frost resistance of two varieties – high (88 % of surviving plants exposed to a temperature of –8 °C for 5 hours) in the EtW5 variety and lower (80 %) in the Vladi

variety. ALA increased the frost resistance of both varieties due to an increase in the content of anthocyanins and proline in the coleoptiles of the EtW5 variety and a higher proline content in the Vladi variety.

Keywords: *Triticum aestivum* L., coleoptiles, anthocyanins, proline, 5-aminolevulinic acid (ALA), ALA-dehydratase, porphobilinogenase, genes *PAL*, *CHS*, *PAP-1*, photosynthesis parameters, frost resistance

For citation. Averina N. G., Savina S. M., Yemelyanova A. V., Dremuk I. A., Prischepchik Yu. V. Molecular mechanisms of regulation of anthocyanine biosynthesis, photosynthesis, and frost resistance of winter wheat seedlings treated with the 5-aminolevulinic acid. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 1, pp. 46–54 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-1-46-54>

Введение. Антоцианы представляют собой нефотосинтетические пигменты растений, относящиеся к классу вторичных метаболитов – флавоноидов. Они играют важную физиологическую и экологическую роль в развитии растений, их защите от патогенов и неблагоприятных факторов внешней среды [1]. Обладая мощной антиоксидантной активностью, антоцианы непосредственно участвуют в детоксикации свободных радикалов, способствуя тем самым формированию стрессоустойчивости растений, в том числе к низким температурам. Очищенные растворы антоцианов удаляют практически все виды активных форм кислорода и азота с эффективностью в четыре раза большей, чем аскорбат и α -токоферол [2]. Использование антоцианов в растениеводстве при выращивании хозяйственно ценных сельскохозяйственных культур, в частности озимых, может стать весьма эффективным способом повышения их холодо- и морозоустойчивости. В связи с этим представляет значительный интерес использование в сельскохозяйственном производстве индукторов накопления антоцианов в растениях.

5-Аминолевулиновая кислота (АЛК) – важнейший предшественник в системе биосинтеза тетрапирролов (хлорофиллов и гема), экологически безопасный природный регулятор роста растений и антистрессор, является также высокоэффективным индуктором накопления антоцианов. В литературе показано, что АЛК усиливает обусловленную антоцианами окраску плодов, улучшает не только товарный вид, но и вкусовые качества яблок, персиков, груш, китайской сливы [3]. В кожуре яблок и винограда, обработанных АЛК, отмечено повышение экспрессии генов ключевых ферментов системы биосинтеза антоцианов – фенилаланин аммиаклиазы (*PAL*), халконсинтазы (*CHS*), халконизомеразы (*CHI*), дигидрофлавонол-4-редуктазы (*DFR*) [2; 4]. Под действием экзогенной АЛК отмечено повышение экспрессии некоторых транскрипционных факторов, таких как *HY5*, который участвует в передаче светового сигнала и усиливает накопление антоцианов [5], а также *MdMYB10* и *MdMYB9*, контролирующие активность структурных генов и участвующие в синтезе антоцианов [4]. Отмечено положительное действие экзогенной АЛК на накопление антоцианов в важнейшей сельскохозяйственной культуре – озимом рапсе [5]. Вместе с тем отсутствуют данные о влиянии экзогенной АЛК на систему биосинтеза антоцианов и их содержание в злаковых культурах и связанную с этим устойчивость этих культур к стрессам.

Хорошим объектом для изучения роли обогащенных антоцианами разных тканей и органов растений в формировании их стрессоустойчивости является пшеница, для которой расшифрованы гены, контролирующие пигментацию отдельных ее органов, таких как колеоптили (*Rc*-гены), стебли (*Pc*), зерно (*R*), перикарп (*Pp*), пыльники (*Pan*) и др. [6], а также показана регуляторная природа этих генов [6]. Важная роль в формировании устойчивости растений к абиотическим и биотическим факторам внешней среды отводится колеоптилям пшеницы. Так, показана защитная роль антоцианов, содержащихся в колеоптилях проростков пшеницы, выращиваемых в присутствии ионов Cd [7]. Проростки близко изогенных линий пшеницы с интенсивно окрашенными в красный цвет колеоптилями и высоким содержанием антоцианов обладали большей устойчивостью к засухе по сравнению с растениями со слабо окрашенными органами и низким уровнем в них антоцианов [8]. Отмечена защита корневой системы и побегов от засухи в присутствии антоцианов в колеоптилях пшеницы, а также высокая устойчивость к заражению головней [8]. Особый интерес представляет озимая пшеница, зимостойкость которой является одной из важнейших характеристик ее адаптивности. Данные о наличии связи между содержанием антоцианов в колеоптилях и морозоустойчивостью растений пшеницы отсутствуют. В связи с этим представляло значительный интерес изучить влияние экзогенной АЛК на накопление антоцианов в сортах озимой пшеницы, характеризующихся красными и зелеными колеоптилями, на экс-

прессию в них структурных генов фенилпропаноидного и флавоноидного участков пути биосинтеза антоцианов – *PAL* и *CHS*, экспрессию регуляторного гена *PAP-1*, кодирующего транскрипционный фактор PAP1/ТаMYB75, участвующего в тканеспецифическом контроле экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов, а также на ряд фотосинтетических показателей и морозоустойчивость исследуемых сортов озимой пшеницы.

Материалы и методы исследования. *Объектом исследования* служили колеоптилы 7–8-дневных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта ЭтW5, характеризующегося красной окраской колеоптилей, и сорта Влади, характеризующегося зеленой окраской колеоптилей. Семена пшеницы были предоставлены Республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр земледелия Национальной академии наук Беларуси». Семена предварительно замачивали в дистиллированной воде (контроль) или в растворе АЛК в концентрации 50 мг/л (вариант «АЛК») на 2 ч при температуре 25 ± 2 °С, затем их высаживали в грунт «Восторг» и выращивали в лабораторных условиях при температуре 25 ± 2 °С до 7–8-дневного возраста.

Содержание антоцианов определяли согласно методу [9]. Навеску 0,1 г колеоптилей растирали в охлажденной фарфоровой ступке в 0,5 мл дистиллированной воды, содержащей 1 % HCl. Остаток в ступке еще раз смывали 0,5 мл раствора. К экстракту добавляли 1 мл хлороформа и центрифугировали в течение 10 мин на центрифуге с охлаждением Sigma 1–15 K (Sigma Laborzentrifugen, Германия) при 3000 g и температуре 4 °С. В супернатанте измеряли оптическую плотность при 510 нм на спектрофотометре Solar PB 2201 (Беларусь). Содержание антоцианов рассчитывали в мкмольях на г сырой массы (в эквиваленте цианидин-3-глюкозида), используя коэффициент молярной экстинкции $29,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Количество хлорофилла (Хл) оценивали по спектрам поглощения ацетоновых экстрактов колеоптилей на спектрофотометре Uvikon-931 (Германия), используя формулы Шлыка [10].

Для определения содержания пролина навеску колеоптилей (0,1 г) растирали в 1 мл 3 %-ной сульфосалициловой кислоты и центрифугировали 10 мин при 18000 g на центрифуге с охлаждением Sigma 1-15 K. К 0,25 мл образовавшегося супернатанта добавляли равные объемы ледяной уксусной кислоты и кислого нингидринового реагента [11]. Полученные пробы инкубировали в течение 1 ч при 90 °С, используя термощейкер BIOSANTS-100 (BiosanLtd., Латвия). От оптической плотности раствора при 515 нм переходили к содержанию пролина, используя калибровочную кривую.

Уровень экспрессии генов PAL, CHS и PAP-1 оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием термоциклера C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad, США). Суммарную РНК выделяли из свежих колеоптилей с помощью Tri-reagent (Sigma-Aldrich, США) и количественно определяли с помощью спектрофотометра ND-2000 (Thermo Scientific, США). Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони. Синтез кДНК проводили с помощью набора реагентов ProtoScript II Reverse Transcriptase (New England BioLabsing, США) в амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США). Реакцию ПЦР проводили с помощью 2,5-кратной реакционной смеси для ПЦР в реальном времени в присутствии EVA Green (Синтол, Россия) с использованием ген-специфичных праймеров для целевых генов *PAL* – CGCCGAGGCTATTGACATCT (прямой) и GTTCCTCACCGCTGTCTTCA (обратный), *CHS* – AAAGGCGATCAAGGAGTGGG (прямой) и GGCGAAGACCGAGCATCTTA (обратный), *PAP-1* – ACAAGAAGCGCCCTGAAACT (прямой) и ACAGCGTTGGACCTGATGAA (обратный) и гена нормализатора *act* – TGGACGTCACCAAC (прямой) и AGGTCAAGACGAAGGATGGC (обратный).

Выделение из растений белков ФСП, их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле, вестерн-блот анализ и оценку содержания выполняли как описано в [12]. Иммунодетекцию белков на нитроцеллюлозной мембране проводили с помощью антител на белок D1 реакционного центра и на белок Lhcb4 светособирающего комплекса ФСП (фирма Agrisera). Количество белков рассчитывали в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу TotalLab 2.01.

Активность АЛК-дегидратазы и порфобилиногеназы (ПБГ) (комплекса порфобилиногендеаминазы и уропорфириноген III-синтетазы) определяли как описано в [13]. Навеску 0,5 г колеоптилей растирали в охлажденных ступках в 1,5 мл 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 8,2), содержащего 0,2 М $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, а также 0,05 М ДТТ. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань и к 0,5 мл добавляли 2 мл 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 8,2), 0,2 мл 0,2 М $MgCl_2$, 0,2 мл 0,05 М ДТТ, 0,6 мл H_2O и 0,5 мл раствора АЛК (опыт) или H_2O (контроль). Полученные пробы инкубировали 2 ч при 37 °С. Реакцию останавливали, добавляя 0,8 мл смеси 3 М трихлоруксусной кислоты: 0,2 М $MgCl_2$ (1 : 1, V : V). Для определения ПБГ к 2 мл раствора добавляли 2 мл модифицированного реагента Эрлиха и определяли оптическую плотность раствора при 553 нм. Использовали молярный коэффициент экстинкции $6,2 \cdot 10^4$ (М · см)⁻¹. Количество ПБГ, превратившегося в уропорфириноген III под действием порфобилиногеназы, определяли, добавляя к раствору 2 мл 5-нормального НСl и через 10 мин регистрировали оптическую плотность при 406 нм. Использовали молярный коэффициент экстинкции $530 \cdot 10^3$ (М · см)⁻¹.

Для оценки влияния АЛК на устойчивость проростков к отрицательным температурам 8-дневные проростки помещали в климатическую камеру (ClimaCell, Чехия) и выдерживали при температуре –8 °С в течение 5 ч. Затем проростки переносили в нормальные условия выращивания при $+25 \pm 2$ °С на 24 ч и оценивали процент выживших или погибших проростков на следующие сутки.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ Excel 2010 и программы Bio-Rad CFX Maestro. Различия считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$. Результаты анализа представляли в виде относительной нормализованной экспрессии в отн. ед. (относительно контрольного варианта для сорта ЭтW5).

Результаты и их обсуждение. В качестве объектов исследования были выбраны два сорта озимой пшеницы, различающиеся по окраске колеоптилей: сорт ЭтW5 с красной окраской и сорт Влади с зеленой окраской колеоптилей.

Оценка содержания антоцианов в колеоптилях 8-дневных проростков двух сортов озимой пшеницы показала, что у сорта ЭтW5 оно составило в среднем 412 ± 52 мкмоль/г сырой массы, что практически в 33 раза превышало таковое в сорте Влади с зелеными колеоптилями – $12,5 \pm 1,2$ мкмоль/г сырой массы. Под действием экзогенной АЛК колеоптили проростков сорта ЭтW5 приобретали более интенсивное красное окрашивание ткани, что было обусловлено повышением содержания в них антоцианов в 1,5 раза по сравнению с контролем. Напротив, в сорте Влади визуальных изменений в окраске колеоптилей под действием АЛК не было зафиксировано. Среднее содержание антоцианов в колеоптилях этого сорта оставалось низким и было в 27 раз ниже по сравнению с данным показателем в сорте ЭтW5.

С целью выявления взаимосвязи между способностью к накоплению антоцианов под действием экзогенной АЛК и экспрессией ряда структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов в исследуемых сортах озимой пшеницы методом ПЦР в реальном времени оценивали уровни экспрессии структурных генов – *PAL* и *CHS*, а также гена *PAP-1*, кодирующего транскрипционный фактор PAP1/TaMYB75.

Уровень относительной нормализованной по актину экспрессии гена *PAL* в колеоптилях контрольных, не обработанных АЛК растений сортов ЭтW5 и Влади, был примерно одинаков, хотя сорт Влади показал на 12,5 % более низкий уровень экспрессии – $0,96 \pm 0,10$ и $0,84 \pm 0,14$ соответственно. Экзогенная АЛК увеличила экспрессию гена *PAL* в сорте ЭтW5 в 1,46 раза, но не изменила уровень экспрессии *PAL* в колеоптилях растений сорта Влади – $0,89 \pm 0,24$ (вариант «АЛК») (рис. 1, а). Таким образом, при выращивании растений пшеницы на воде уровень экспрессии гена *PAL* не зависел от сорта и содержания антоцианов в колеоптиях. Действие экзогенной АЛК показало сортоспецифичность и усилило экспрессию *PAL* в растениях сорта ЭтW5, колеоптили которых были обогащены антоцианами.

Уровень относительной экспрессии структурного гена *CHS* в колеоптилях контрольных растений сорта ЭтW5 был в 1,6 раз выше такового у сорта Влади – $0,94 \pm 0,08$ и $0,59 \pm 0,14$ соответственно. Экзогенная АЛК значительно (в 18 раз) увеличила экспрессию гена *CHS* в красных колеоптилях сорта ЭтW5 ($16,84 \pm 4,78$) и на 43 % снизила уровень экспрессии гена в колеоптилях сорта Влади ($0,34 \pm 0,16$) (рис. 1, б).

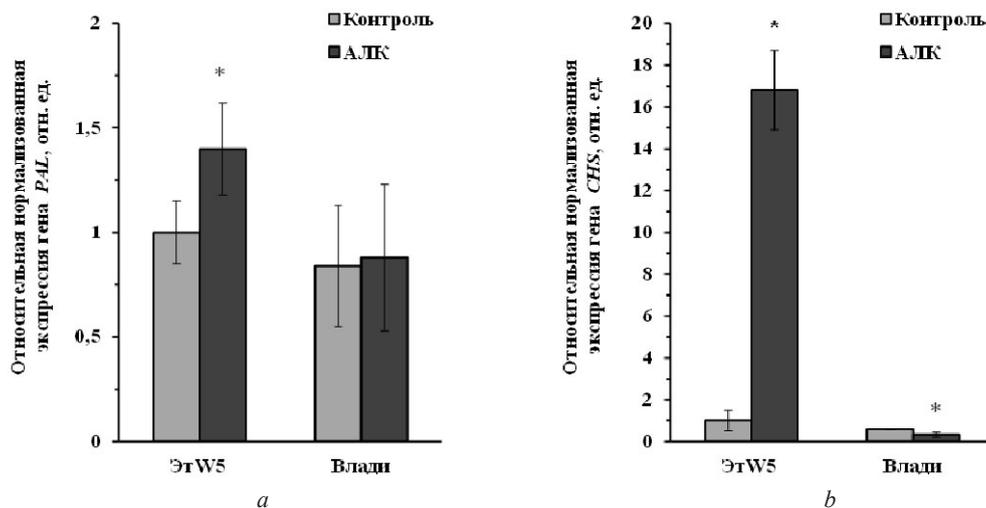


Рис. 1. Влияние экзогенной АЛК в концентрации 50 мг/л на экспрессию генов *PAL* (a) и *CHS* (b) в coleoptилях озимой пшеницы сортов ЭтW5 и Влади. За 100 % принят уровень экспрессии генов *PAL* и *CHS* в coleoptилях контрольных растений сорта ЭтW5. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0,05$

Fig. 1. The effect of exogenous ALA at a concentration of 50 mg/l on the expression of the *PAL* (a) and *CHS* (b) genes in coleoptiles of winter wheat varieties EtW5 and Vladi. The level of expression of the *PAL* and *CHS* genes in the coleoptiles of control plants of the EtW5 variety was taken as 100 %. * – differences compared to control are significant at $p \leq 0.05$

Анализ экспрессии регуляторного гена *PAP-1*, кодирующего транскрипционный фактор PAP1/TaMYB75, который контролирует тканеспецифическую экспрессию структурных генов биосинтеза антоцианов, показал, что уровень экспрессии гена в coleoptилях контрольных растений пшеницы сорта ЭтW5 был на порядок выше, чем уровень экспрессии данного гена в зеленых coleoptилях сорта Влади – $0,91 \pm 0,23$ и $0,09 \pm 0,03$ соответственно (рис. 2).

Под действием экзогенной АЛК наблюдали возрастание в 1,4 раза экспрессии *PAP-1* в coleoptилях растений сорта ЭтW5 – $1,27 \pm 0,24$. При этом в coleoptилях растений сорта Влади, обработанных АЛК, экспрессию гена *PAP-1* детектировать не удалось.

Таким образом, при выращивании растений пшеницы в контрольных условиях на воде в обогащенных антоцианами красных coleoptилях сорта ЭтW5 отмечена более высокая экспрессия структурного гена флавоноидного участка пути биосинтеза антоцианов – *CHS*, и регуляторного гена *PAP1/TaMYB75*, по сравнению с зелеными coleoptилями растений сорта Влади. Действие

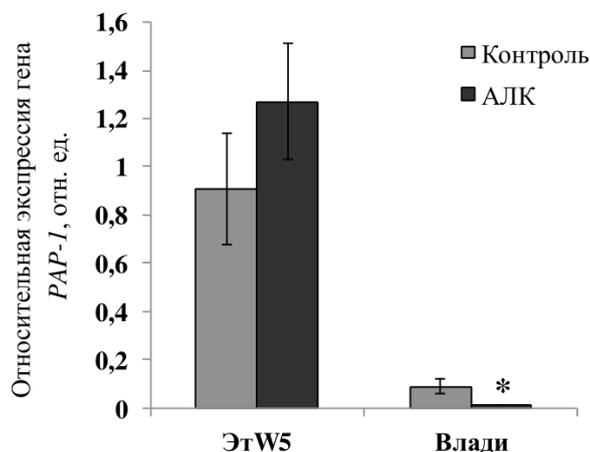


Рис. 2. Влияние экзогенной АЛК в концентрации 50 мг/л на экспрессию гена *PAP-1* в coleoptилях озимой пшеницы сортов ЭтW5 и Влади. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0,05$

Fig. 2. The effect of exogenous ALA at a concentration of 50 mg/l on the expression of the *PAP-1* gene in coleoptiles of winter wheat varieties EtW5 and Vladi. * – differences compared to control are significant at $p \leq 0.05$

экзогенной АЛК, положительное в случае экспрессии генов биосинтеза антоцианов в колеоптилях пшеницы сорта ЭтW5 и отрицательное у сорта Влади, является сортоспецифичным и определяется начальным уровнем содержания антоцианов в ткани.

Основываясь на предположении о том, что две метаболические системы – синтез Хл и антоцианов противоположным образом реагируют на пластидно-ядерную сигнализацию, запускаемую активными формами кислорода, генерируемыми в присутствии экзогенной АЛК [14], была дана оценка ряда фотосинтетических показателей – содержание Хл *a*, *b*, активности участвующих в их синтезе ферментов – АЛК-дегидратазы и порфобилиногеназы, корового белка Д-1 и белка Lhcb-4 ФСII, а также активность фотосинтеза.

В 7-дневных проростках ЭтW5 среднее содержание Хл *a* в колеоптилях составило 323 ± 20 мкг/г сырой массы и Хл *b* 118 ± 23 мкг/г сырой массы. У сорта Влади содержание Хл *a* и *b* составило в среднем 80 % от такового у сорта ЭтW5 – 260 ± 15 мкг/г сырой массы Хл *a* и 91 ± 15 мкг/г сырой массы Хл *b*, при том, что активность участвующих в образовании Хл ферментов – АЛК-дегидратазы и ПБГ-азы практически не отличалась (111 и 103 %) от активности ферментов у сорта ЭтW5, принятых за 100 %. В обработанных АЛК растениях сорта ЭтW5 содержание Хл *a* и *b* снизилось на 19 и 16 % соответственно, в то время как у сорта Влади лишь на 4 и 8 %, т. е. практически не изменилось. Экзогенная АЛК не повлияла на активность АЛК-дегидратазы и ПБГ-азы у сорта ЭтW5 и снизила активность ферментов на 25 и 16 % у сорта Влади. Снижение под действием АЛК содержания Хл и параллельное возрастание содержания антоцианов в колеоптилях сорта ЭтW5 подкрепляет гипотезу о том, что тетрапиррол-зависимая генерация АФК через пластидно-ядерную сигнализацию оказывает противоположное действие на две метаболические системы – синтез антоцианов и синтез Хл, что согласуется с результатами, представленными в работе профессора Гримма и соавт. [15].

Оценка ряда фотосинтетических показателей в колеоптилях контрольных растений двух сортов показала незначительные различия этих характеристик друг от друга (таблица). Так, если значения этих показателей у сорта ЭтW5 принять за 100 %, то у сорта Влади содержание корового белка Д-1 и белка Lhcb-4 ФСII составило 113 и 108 %, максимальный квантовый выход ФСII (F_v/F_m) – 103 %, что совпадает с данными о коэффициенте фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла q_P – 95 % и скорости транспорта электронов через ФСII – 99 %. Коэффициенты нефотохимического тушения флуоресценции ФСII по показателям NPQ и q_N составили у сорта Влади соответственно 98 и 96 % по сравнению с сортом ЭтW5. Разница в содержании Хл около 20 % между контрольными растениями обоих сортов, а также между растениями, обработанными АЛК, практически не сказалась на максимальном квантовом выходе ФСII (F_v/F_m), что совпадает с результатами, отметившими неизменность показателя F_v/F_m вплоть до значительного (в 3–5 раз) уменьшения содержания Хл в листе¹. Полученные результаты свидетельствуют о высокой фотохимической активности ФСII в колеоптилях обоих сортов и независимости этого процесса от исходного содержания антоцианов в колеоптилях. Вместе с тем экзогенная АЛК на 18 % (NPQ) и на 14 % (q_N) снизила коэффициенты нефотохимического тушения флуоресценции в колеоптилях сорта ЭтW5 и на 41 и 27 % повысила эти показатели у сорта Влади, снизив, таким образом, тепловую диссипацию энергии возбуждения в комплексах ФСII у сорта, обогащенного антоцианами, и существенно повысила уровень этих процессов у сорта Влади (таблица), поддерживая представление о том, что наличие антоцианов в значительной степени защищает фотосинтетический аппарат от реакций фотоингибирования.

Была проведена оценка морозоустойчивости изучаемых сортов, контрастных по содержанию антоцианов. Проростки озимой пшеницы в возрасте восьми дней выдерживали в течение 5 ч при температуре -8 °С и подсчитывали потерявшие тургор стебли сразу после выноса растений из климатической камеры и процент погибших проростков на следующие сутки. Оба сорта показали разную морозоустойчивость – высокую в случае ЭтW5 (88 % выживших проростков) и более низкую у сорта Влади (80 % выживших проростков). При предварительном замачивании семян пше-

¹ Калмацкая О. А. Флуоресцентные показатели листьев растений: влияние условий освещения и обработки физиологическими веществами: дис. ... канд. физ.-мат. М., 2017.

Абсолютные и относительные значения параметров индукции флуоресценции хлорофилла ФСII

Absolute and relative values of PSII chlorophyll fluorescence induction parameters

Параметр Parameter	Вариант Variant			
	ЭтW5, вода	ЭтW5, АЛК	Влади, вода	Влади, АЛК
Fv/Fm	0,729 ± 0,022 100 %	0,762 ± 0,007 104 %	0,752 ± 0,001 100 %	0,752 ± 0,008 100 %
qP	0,903 ± 0,034 100 %	0,861 ± 0,030 95 %	0,857 ± 0,023 100 %	0,798 ± 0,001 93 %
NPQ	0,210 ± 0,028 100 %	0,172 ± 0,013 82 %	0,207 ± 0,057 100 %	0,293 ± 0,047* 141 %
qN	0,217 ± 0,020 100 %	0,187 ± 0,018 86 %	0,208 ± 0,047 100 %	0,264 ± 0,018* 127 %
ETR(II)	33,99 ± 0,037 100 %	32,25 ± 3,425 95 %	33,74 ± 1,313 100 %	30,40 ± 0,150 90 %

Примечание. * – Различия достоверны, $p < 0,05$.

Note. * – The differences are significant, $p < 0.05$.

ницы в растворе АЛК в концентрации 50 мг/л морозоустойчивость обоих сортов повышалась. Так, выживаемость проростков сорта ЭтW5 через сутки после действия отрицательной температуры составила 97 ± 1 %, а сорта Влади – 93 ± 3 %. Небольшие различия в морозоустойчивости изучаемых сортов озимой пшеницы, существенно различающихся по содержанию в колеоптилях растений антоцианов, может свидетельствовать и о других механизмах формирования устойчивости к отрицательным температурам, не связанных с содержанием антоцианов. Известно, что под действием экзогенной АЛК в ряде сельскохозяйственных культур, таких, например, как ячмень и озимый рапс, возрастает содержание универсального стресс-протектора пролина [5], выполняющего целый ряд защитных функций, участвуя в качестве тушителя синглетного кислорода и H_2O_2 , а также перехватчика свободных радикалов. В колеоптилях контрольных растений сорта ЭтW5 уровень пролина (89 ± 18 мкг/г сырой массы) составил лишь 42 % по сравнению с таковым у сорта Влади (212 ± 15 мкг/г сырой массы), что указывает на положительную роль антоцианов в поддержании морозоустойчивости растений этого сорта. Предварительное замачивание семян в растворе АЛК приводило к одинаковому возрастанию содержания пролина в колеоптилях ЭтW5 и Влади – в 1,43 и 1,36 раза соответственно, а в колеоптилях сорта ЭтW5 еще и возрастанию содержания антоцианов в 1,5 раза. Несомненно, что оба фактора, и антоцианы и пролин, играют положительную роль в формировании морозоустойчивости. По-видимому, в условиях низкого уровня антоцианов в растениях сорта Влади основную роль в морозоустойчивости растений играет универсальный антистрессор пролин, который в условиях стресса берет на себя функцию основного защитного агента.

Таким образом, в колеоптилях растений озимой пшеницы сорта ЭтW5, обогащенных антоцианами, экзогенная АЛК простимулировала накопление этих пигментов и повысила уровень экспрессии структурных (*PAL*, *CHS*) и регуляторного (*PAP-1*) генов пути биосинтеза антоцианов. В колеоптилях растений сорта Влади, выращенных на воде и содержащих в 33 раза меньшее количество антоцианов по сравнению с сортом ЭтW5, экспрессия *CHS* и *PAP-1* была снижена и дополнительно заингибирована с помощью АЛК. Таким образом, в обработанных АЛК растениях озимой пшеницы генетическая активность фенилпропаноидного и флавоноидного участков пути биосинтеза антоцианов показывает отчетливую сортоспецифичность и зависимость от уровня антоцианов. Разница в содержании антоцианов и Хл между растениями двух сортов практически не сказалась на активности участвующих в хлорофиллообразовании ферментов – АЛК-дегидратазы и порфобилиногеназы, а также на важнейших показателях фотосинтетической активности – содержании корового белка Д-1 и Lhcb-4 ФСII, максимальном квантовом выходе ФСII (Fv/Fm), коэффициенте фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла qP, скорости транспорта электронов через ФСII и на коэффициентах нефотохимического тушения

флуоресценции ФСII по показателям NPQ и qN. АЛК практически не повлияла на основные показатели фотосинтетической активности – Fv/Fm и qP, но значительно снизила тепловую диссипацию энергии возбуждения в комплексах ФСII у обогащенного антоцианами сорта ЭтW5 и существенно повысила уровень этих процессов у сорта Влади. Отмечена сортоспецифичность в уровнях морозостойкости двух сортов – высокий (88 % выживших растений, подвергшихся действию температуры –8 °С в течение 5 ч) у сорта ЭтW5 и более низкий (80 %) у сорта Влади. АЛК повысила морозоустойчивость обоих сортов соответственно до величин 97 ± 1 и 93 ± 3 % за счет увеличения содержания антоцианов и пролина в колеоптилях сорта ЭтW5 и значительно, в 2,3 раза большего, содержания пролина у сорта Влади. По-видимому, в условиях низкого уровня антоцианов в растениях сорта Влади основную роль в морозоустойчивости растений играет универсальный антистрессор пролин, который в условиях стресса берет на себя функцию основного защитного агента.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор № Б20ГРМГ-001). Авторы также выражают благодарность канд. биол. наук, доценту С. И. Гордею – руководителю отдела озимых зерновых культур в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» за предоставление семян сортов озимой пшеницы.

Acknowledgements. The work was supported by the BRFFR (contract no. Б20ГРМГ-001). The authors also express their sincere gratitude to Ph. D. (Biology), Associate Professor S. I. Gordey – Head of the Department of winter grain crops in RUE “Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Agriculture” for providing seeds of winter wheat varieties.

Список использованных источников

1. Peer, W. A. Flavonoids as Signal Molecules: Targets of Flavonoid Action / W. A. Peer, A. S. Murphy // *The Science of Flavonoids*. – 2008. – P. 239–268. https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_9
2. Zhao, H. J. Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosynthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress / H. J. Zhao, Q. Zou // *Photosynthetica*. – 2002. – Vol. 40, N 4. – P. 523–527. <https://doi.org/10.1023/a:1024339716382>
3. 5-Aminolevulinic acid affects fruit coloration, growth, and nutrition quality of *Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao in Hainan, tropical China / S. Feng [et al.] // *Sci. Hortic.* – 2015. – Vol. 193. – P. 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.010>
4. Zhang, Zh. Effects of 5-aminolevulinic acid on Anthocyanin synthesis in *Vitis Vinifera* ‘Crimson Seedless’ grapes at the transcriptomics level / Zh. Zhang // *J. Horticultural Sci. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 96, N 6. – P. 797–807. <https://doi.org/10.1080/14620316.2021.1930589>
5. Молекулярно-генетические механизмы регуляции дигидрофлавонол редуктазы и транскрипционного фактора HY5 экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой в проростках озимого рапса / Н. Г. Аверина [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 317–324. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-317-324>
6. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений / В. Ф. Аджиева [и др.] // Вавиловский журн. генетики и селекции. – 2015. – Т. 19, № 5. – С. 561–573. <https://doi.org/10.18699/vj15.073>
7. Shoeva, O. Yu. Anthocyanins participate in the protection of wheat seedlings against cadmium stress / O. Yu. Shoeva, E. K. Khlestkina // *Cereal Research Communications*. – 2018. – Vol. 46, N 2. – P. 242–252. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.070>
8. Anthocyanins participate in protection of wheat seedlings from osmotic stress / O. Yu. Shoeva [et al.] // *Cereal Research Communications*. – 2017. – Vol. 45, N 1. – P. 47–56. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.044>
9. Mabry, T. J. The systematic identification of flavonoids / T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas. – Berlin: Heidelberg, 1970. – P. 261–266. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0>
10. Шлык, А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* / А. А. Шлык // Биохимия. – 1968. – Т. 33, вып. 2. – С. 275–285.
11. Misra, N. Effect of Salt Stress on Proline Metabolism in Two High Yielding Genotypes of Green Gram / N. Misra, A. K. Gupta // *Plant Sci.* – 2005. – Vol. 169, N 2. – P. 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.013>
12. Kruse E., Mock H.-P., Grimm B. Coproporphyrinogen III oxidase from barley and tobacco – sequence analysis and initial expression studies / E. Kruse, H.-P. Mock, B. Grimm // *Planta*. – 1995. – Vol. 196. – P. 796–803. <https://doi.org/10.1007/bf01106776>
13. Shemin, D. Delta-aminolevulinic acid dehydrase from *Rhodospseudomonas sphaeroides* / D. Shemin // *Methods in Enzymology* / eds. S. P. Colowick, N. O. Koplman. – Academic Press, 1962. – Vol. 5. – P. 883–884. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(62\)05333-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(62)05333-1)
14. Аверина, Н. Г. Метаболические перестройки и регуляция биосинтеза антоцианов в растениях озимого рапса (*Brassica napus* L.) под действием 5-аминолевулиновой кислоты / Н. Г. Аверина, А. В. Емельянова // Сб. тез. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». – Минск, 2022. – С. 49.
15. The genomes uncoupled – dependent signaling pathway coordinates plastid biogenesis with the synthesis of anthocyanins / A. S. Richter [et al.] // *Phil. Trans. R. Soc. B*. – 2020. – Vol. 375, N 1801. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0403>

References

- Peer W. A., Murphy A. S. Flavonoids as Signal Molecules: Targets of Flavonoid Action. *The Science of Flavonoids*, 2008, pp. 239–268. https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_9
- Zhao H. J., Zou Q. Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosynthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress. *Photosynthetica*, 2002, vol. 40, no. 4, pp. 523–527. <https://doi.org/10.1023/a:1024339716382>
- Feng S., Li M. F., Wu F., Li W.-L., Li S.-P. 5-Aminolevulinic acid affects fruit coloration, growth, and nutrition quality of *Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao in Hainan, tropical China. *Scientia Horticulturae*, 2015, vol. 193, pp. 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.010>
- Zhang Zh., Liu L., Chang X., He W., Liu J., Zhao B., Sun J. Effects of 5-aminolevulinic acid on Anthocyanin synthesis in *Vitis Vinifera* ‘Crimson Seedless’ grapes at the transcriptomics level. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2021, vol. 96, no. 6, pp. 797–807. <https://doi.org/10.1080/14620316.2021.1930589>
- Averina N. G., Yemelyanova H. V., Kaliaha T. G., Savina S. M. Molecular-genetic mechanisms of regulation of digydroflavonol reductase and transcription factor HY5 by exogenous 5-aminolevulinic acid in winter rape plants. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 3, pp. 317–324 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-317-324>
- Adzhieva V. F., Babak O. G., Shoeva O. Y., Kilchevsky A. V., Khlestkina E. K. Molecular-genetic mechanisms underlying fruit and seed coloration in plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2015, vol. 19, no. 5, pp. 561–573. <https://doi.org/10.18699/vj15.073>
- Shoeva O. Yu., Khlestkina E. K. Anthocyanins participate in the protection of wheat seedlings against cadmium stress. *Cereal Research Communications*, 2018, vol. 46, no. 2, pp. 242–252. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.070>
- Shoeva O. Yu., Gordeeva E. I., Arbuzova V. S., Khlestkina E. K. Anthocyanins participate in protection of wheat seedlings from osmotic stress. *Cereal Research Communications*, 2017, vol. 45, no. 1, pp. 47–56. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.044>
- Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Heidelberg, 1970, pp. 261–266. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0>
- Shlyk A. A. On spectrophotometric determination of chlorophylls *a* and *b*. *Biokhimiya = Biochemistry*, 1968, vol. 33, no. 2, pp. 275–285.
- Misra N., Gupta A. K. Effect of Salt Stress on Proline Metabolism in Two High Yielding Genotypes of Green Gram. *Plant Science*, 2005, vol. 169, no. 2, pp. 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.013>
- Kruse E., Mock H.-P., Grimm B. Coproporphyrinogen III oxidase from barley and tobacco – sequence analysis and initial expression studies. *Planta*, 1995, vol. 196, pp. 796–803. <https://doi.org/10.1007/bf01106776>
- Shemin D. Delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Colowick S. P., Koplan N. O., eds. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1962, vol. 5, pp. 883–884. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(62\)05333-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(62)05333-1)
- Averina N. G., Emel'yanova A. V. Metabolic rearrangements and regulation of anthocyanin biosynthesis in winter rape-seed plants (*Brassica napus* L.) under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniya biosistem: sbornik tezisov konferentsii* [Molecular, membrane and cellular basis of the functioning of biosystems: Collection of abstracts from the conference]. Minsk, 2022, pp. 49 (in Russian).
- Richter A. S., Tohge T., Femie A. R., Grimm B. The genomes uncoupled – dependent signaling pathway coordinates plastid biogenesis with the synthesis of anthocyanins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2020, vol. 375, no. 1801, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0403>

Информация об авторах

Аверина Наталья Георгиевна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник, профессор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: averina@ibp.org.by

Савина Светлана Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svetlanapavluchkova@yandex.ru

Емельянова Анна Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yashchuk.anna@mail.ru

Дремук Ирина Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irinadremuk@yandex.ru

Прищепчик Юлия Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuliya_prishchepchik@mail.ru

Information about the authors

Averina Natalya G. – D. Sc. (Biology), Chief Researcher, Professor. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: averina@ibp.org.by

Savina Svetlana M. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svetlanapavluchkova@yandex.ru

Emelyanova Anna V. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yashchuk.anna@mail.ru

Dremuk Irina A. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irinadremuk@yandex.ru

Prishchepchik Yulia V. – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yuliya_prishchepchik@mail.ru