

УДК 631.811.98

СТИМУЛИРОВАНИЕ СИНТЕЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ PAL-АССОЦИИРОВАННЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**П.В. Федуреав, Л.Н. Скрыпник, А.В. Рябова, А.В. Пунгин, Э.В. Токупова, П.В. Масленников***Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Калининград, Россия***ВВЕДЕНИЕ**

Ароматические аминокислоты, такие как фенилаланин и тирозин, являющиеся конечными звеньями шикиматного пути, выступают в качестве субстратов для фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) и играют для данного фермента роль своеобразных эффекторов, стимулируя синтез вторичных метаболитов [1].

PAL является первым и ключевым регуляторным ферментом метаболизма фенилпропаноидов. Фактически, он осуществляет «переключение» от первичного метаболизма растения ко вторичному метаболизму, приводя к образованию широкого спектра вторичных метаболитов с фенилпропаноидным скелетом. PAL может активироваться при различных воздействиях окружающей среды, таких как механическое повреждение тканей растений, повышенные концентрации тяжелых металлов в почве, а также дефицит основных компонентов питания растений. Это делает его отличным индуктором, запускающим реакции направленные на увеличение устойчивости растений [2].

Изучение особенностей метаболизма растений является естественным шагом на пути к улучшению их роста и производительности, в частности злаковых растений и пшеницы, что неизменно приводит к повышению качества и количества с/х продукции. Стоит отметить, что проблема устойчивости наиболее часто рассматривается в контексте выращивания сельскохозяйственных монокультур. Подобный способ выращивания сопряжен с повышенной нагрузкой на растения со стороны как биотических, так и абиотических факторов [3].

Таким образом целью настоящей работы является оценка роли фенилаланина и тирозина на PAL ассоциированные метаболические пути, и, в частности, на биосинтез и накопление фенольных соединений, в том числе и лигнина у растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Ванек» были получены на посевной станции Министерства сельского хозяйства Калининградской области. Для стерилизации семена инкубировали в течение 2 ч в 10 % растворе NaClO, затем растительный материал 10 раз промывали дистиллированной водой. Для проведения лабораторных экспериментов семена *Triticum aestivum* L. первоначально проращивали в дистиллированной воде. Проростки в возрасте 3–4 дней пересаживали на перлит, пропитанный 50 % питательным раствором Хогланда. Растения выращивали под люминесцентными лампами при плотности потоков квантов ФАР 200 мкмоль/(м² с), 16-часовом фотопериоде и температуре +25 °С.

С целью исследования отдельного влияния тирозина и фенилаланина на метаболические процессы растений, использовались растворы указанных веществ в концентрациях: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 мкМ. Растения в возрасте 30 дней (соответствует 4, 5 стадии по шкале Фики) переносили на экспериментальные растворы (с добавлением соответствующих аминокислот). Растения экспонировались на указанных субстратах с добавлением в действующих веществ в течение 1, 2, 4 и 8 часов. В качестве контроля использовали 50 % раствор Хогланда. Для дальнейших экспериментов использовались листья растений.

Подготовка растительного экстракта для анализа фенольных соединений: 0,1–0,2 г растительного материала гомогенизировали с 10 мл 96 %-ного раствора этанола, центрифугировали при 4500g в течение 30 мин. Супернатант использовали для анализа суммы фенольных соединений. Общее содержание фенольных соединений определяли методом Фолина–Чокальтеу. Кратко, экстракт смешивали с 0,2 М реагента Фолина–Чокальтеу и инкубировали в течение 10 мин в условиях затенения. После этого в каждую пробирку добавляли 6,75 % раствора карбоната натрия (Na₂ CO₃), после чего пробирки инкубировали в течение 30 мин, также в условиях затенения. Поглощение полученной смеси измеряли при 765 нм (UV-3600, Shimadzu, Киото, Япония). Концентрационное значение суммы фенольных соединений представлено в виде мкг эквивалента галловой кислоты на грамм сухой массы (мкг ЭГК г⁻¹) [4].

Тотальную РНК из экспериментальных образцов пшеницы экстрагировали с использованием тризола ("Invitrogen", США) [5]. Для синтеза кДНК пробы РНК обрабатывали ДНКазой 1 ("Thermo Scientific", США). Синтез одноцепочечной кДНК из тотальной РНК проводили с использованием набора Revert Aid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit ("Thermo Scientific", США). Проводили спектрофотометрическое измерение концентрации кДНК на спектрофотометре SmartSpec Plus Spectrophotometer ("BioRad", США).

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на амплификаторе CFX96™ Real-Time System ("Bio-Rad", США) с использованием интеркалирующего красителя SYBRGreen I ("Invitrogen", США). Праймеры были сконструированы с использованием аннотированного генома пшеницы, депонированного в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для оценки относительных уровней экспрессии анализируемых генов использовали метод $\Delta\Delta C_t$ [6].

Было показано, что экспрессия PAL6, C4H1, 4CL1, C3H1, в частности, имеет достоверную корреляцию с содержанием лигнина [7], а гены CHS, CHI, F3H и DFR достоверно коррелируют с уровнем фенольных соединений растений пшеницы [8], по этой причине данные гены были выбраны для анализа. Ген ARF (ADP-ribosylation factor) и ген кодирующий актин были использованы в качестве генов сравнения.

Эксперименты выполнены как минимум в трех повторностях. Уровень значимости был установлен при p -значении $p \leq 0,05$. Данные были проанализированы с использованием SigmaPlot 12.3 (Systat Software GmbH, Эркрат, Германия). Тест Шапиро – Уилкса использовался для проверки нормальности. Кроме того, экспериментальные данные были проверены на однородность дисперсии. Эти тесты позволили нам использовать ANOVA, который был представлен для каждого фактора отдельно (время воздействия, концентрация аминокислоты). Результаты были представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (при $n=3$). Графики были подготовлены с использованием OriginPro 9 (OriginLab Corporation, Нортгемптон, Массачусетс, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень фенольных соединений является отличным маркером потребления фенилаланина и тирозина, которые могут выступать в качестве специфических предшественников в биосинтезе ряда простых фенольных компонентов клетки, а также довольно сложных конденсированных форм флавоноидов. В экспериментальных растениях оценивался суммарный уровень фенольных соединений (рис. 1).

Перенос опытных растений в питательные среды с добавлением фенилаланина привел к значительному увеличению уровня фенольных соединений уже при концентрации активного вещества 100 мкМ, и эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода воздействия (в течение 8 ч.). При переносе растений на питательную среду, содержащую тирозин, не было значительного увеличения уровня фенольных соединений в условиях низкой концентрации предшественника (100, 200 мкМ).

Однако стоит отметить, что изменение накопления фенольных соединений с увеличением концентрации фенилаланина и тирозина в питательной среде от 500 мкМ до 800 мкМ оказалось незначительным. Еще одной общей тенденцией в накоплении фенольных соединений было достижение своеобразного концентрационного плато, через 4 ч воздействия на растения экспериментальных растворов.

Одним из результатов этих испытаний была идентификация определенного времени и оптимальных концентраций введенных прекурсоров. Таким образом, обработка растений 500 мкМ раствором фенилаланина и тирозина в течение 4 ч приводила к значительному ($p \leq 0,05$) увеличению (по сравнению с другими экспериментальными вариантами) оцениваемых соединений.

Уровень экспрессии ряда генов оценивали у растений, экспонированных на питательной среде, обогащенной аминокислотами, ферментативные продукты которых участвуют, с одной стороны, в синтезе лигнина (PAL6, C4H1, 4CL1, C3H1), и ответственны за образование флавоноидов (CHS, CHI, F3H, DFR), с другой. Уровень экспрессии генов анализировали с помощью qRT-PCR в листьях образцов пшеницы, инкубированных на среде, содержащая 500 мкМ фенилаланина и тирозина соответственно, в течение 4 ч (рис. 2).

Присутствие как фенилаланина, так и тирозина в питательной среде приводило к значительному изменению в накоплении транскриптов гена PAL6. Стоит отметить, что этот ген кодирует фермент, который потенциально катализирует превращение обеих аминокислот (фенилаланин и тирозин), играя ключевую роль в последующей регуляции биосинтеза фенилпропаноидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие ароматических протеиногенных аминокислот в PAL/TAL ассоциированных метаболических путях, приводит к увеличению биосинтеза вторичных соединений фенольной природы. Такие изменения можно рассматривать с двух точек зрения; с одной стороны, вторичные соединения являются характерными индукторами устойчивости растений, а с другой стороны, усиление потока через ключевой фермент фенилпропаноидного пути позволяет накапливать физиологически активные вещества, необходимые для потребления человеком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kong, J.Q. Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. RSC Adv. 2015, 5, 62587–62603.
2. Cheng, G.W.; Breen, P.J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1991, 116, 865–869.
3. Lien, G.; Hardaker, J.B.; Flaten, O. Risk and economic sustainability of crop farming systems. Agric. Syst. 2007, 94, 541–552.
4. Feduraev, P.; Chupakhina, G.; Maslennikov, P.; Tacenko, N.; Skrypnik, L. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at Different Growth Stages. Antioxidants 2019, 8, 237.
5. Ermilova E.V., Zalutskaya Zh. M., Nikitin M.M., Lapina T.V., Fernández E. Regulation by light of ammonium transport systems in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell Environ. 2010. V. 33. P. 1049–1056.
6. Livak K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
7. Nguyen, T.N., Son, S., Jordan, M.C., Levin, D.B., & Ayele, B.T. Lignin biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): its response to waterlogging and association with hormonal levels. BMC plant biology, 2016, 16(1), 28.
8. Hong, M.J., Yoon, Y.H., Kim, D.S., Kim, S.H., Kang, S.Y., Kim, D. Y... & Kim, J.B. Phenotypic and molecular responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to chronic gamma irradiation. Journal of Agricultural Science and Technology, 2018, 20(1), 167–178.