

УДК 581.132

МОДУЛЯЦИЯ УРОВНЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И УРОВНЕЙ ШАПЕРОНОВ У РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ *Cucurbitaceae* ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

© 2025 г. Н. П. Юрина^{1,*}, Н. Д. Муртазина¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук. Москва, 119071 Россия

*e-mail: nyurina@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 20.10.2024 г.

После доработки 03.11.2024 г.

Принята к публикации 10.11.2024 г.

Устойчивость растений к абиотическим стрессам во многом определяется взаимодействием антиоксидантной и шаперонной систем клетки, которое еще изучено недостаточно. Изучали действие теплового стресса на уровни активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, **SOD** и каталаза, **CAT**), а также уровни белков теплового шока (**HSP70** цитоплазмы и **HSP70B** хлоропластов) в листьях проростков тыквы трех генотипов (*Cucurbita moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*), различающихся по устойчивости к стрессам окружающей среды. Показано, что при тепловом стрессе уровни активности **CAT** возрастали у всех изученных генотипов. После теплового стресса показано заметное падение (48.9%) уровня активности **CuZn-SOD** у *C. moschata*, по сравнению с возрастанием активности фермента на (2–14.6%) у двух других генотипов. Уровень белков **HSP70** цитоплазмы снижался на 36%, а **HSP70B** хлоропластов на 34% в клетках растений *C. moschata* после действия теплового стресса. Напротив, уровень белков теплового шока **HSP70** цитоплазмы повышался у генотипов *C. pepo* и *C. maxima* на 20 и 18% соответственно, а в случае с белками **HSP70B** хлоропластов повышение составляло 43 и 10%. Установлено, что модуляция уровней активности **CuZn-SOD** (основного представителя фермента в клетке) и уровней шаперонов **HSP70** цитоплазмы и **HSP70B** хлоропластов у генотипов *Cucurbitaceae* скоординирована, что свидетельствует о взаимодействии этих двух защитных систем клетки при тепловом стрессе. Таким образом, уровни **HSP70**, **HSP70B** и уровни активности **CuZn-SOD** являются надежными ранними сигналами предупреждения о тепловом стрессе, позволяя обнаружить стресс до того, как он нанесет серьезные повреждения растению.

Ключевые слова: *Cucurbitaceae*, антиоксидантные ферменты, белки теплового шока **HSP70**, тепловой стресс

DOI: 10.31857/S0555109925020069 **EDN:** EOIQNN

Изменение климата усилило общее воздействие абиотических стрессов, таких как тепловой, засуха, засоление и др. на растения. Абиотический стресс отрицательно влияет на рост, развитие и продуктивность растений. В стрессовых условиях баланс между генерацией активных форм кислорода (**АФК**) и их детоксикацией посредством антиоксидантных механизмов нарушается. Степень нарушения зависит от интенсивности и продолжительности абиотического стресса. Свободные радикалы **АФК** воздействуют на компоненты растительной клетки, такие как белки, липиды, углеводы, ДНК

и клеточные мембраны, вызывая вторичный окислительный стресс. Равновесие между образованием и дезактивацией **АФК** поддерживается как за счет ферментативных, так и неферментативных механизмов антиоксидантной защиты. Неферментативные антиоксиданты включают как жирорастворимые (токоферол и β -каротин), так и водорастворимые (глутатион, аскорбат и т.д.) антиоксиданты. Основными ферментативными антиоксидантами, которые необходимы для гомеостаза **АФК** являются супероксиддисмутаза (**SOD**), каталаза (**CAT**), аскорбатпероксидаза (**APX**), и глу-

тационредуктаза (**GR**) [1]. В то же время, при подержании на относительно низком уровне АФК действуют как сигнальные молекулы, которые регулируют рост, развитие и адаптацию растений к неблагоприятным условиям среды [2–4].

Одним из основных ферментов системы антиоксидантной защиты является SOD, которая представляет первый уровень защиты от супероксидных радикалов. Катализируемая SOD дисмутация пероксидного аниона приводит к образованию пероксида водорода, который, в свою очередь, удаляется с помощью CAT и APX [2]. В ряде исследований сообщалось, что способность растений регулировать образование и дезактивацию АФК связана с более высокой устойчивостью к различным стрессам окружающей среды [5–7]. Показано, что существует корреляция между активностью антиоксидантной системой и устойчивостью растений к тепловому стрессу и засухе [5, 3], засолению [8] или заболачиванию [9].

Шаперонная и антиоксидантная системы клетки активно участвуют в защите растений от окислительного стресса и являются ключевыми регуляторами стрессового ответа растений. Благодаря своей шаперонной активности белки теплового шока (**HSP**) являются универсальными цитопротекторами. Среди семейств HSP, несомненно, семейство белков HSP70 играет жизненно важную роль в ответах как на абиотические, так и на биотические стрессы [10, 11]. Вследствие своих разнообразных функций шапероны HSP70 играют защитную роль при различных видах стрессах, что является определяющим фактором для роста и развития растений. Таким образом, семейство генов белков HSP70 является отличным кандидатом, который можно использовать для повышения устойчивости к множественным стрессам [12]. Недавно были показаны более высокие уровни HSP70 в растениях, устойчивых к стрессу и болезням, по сравнению с восприимчивыми растениями [3, 6, 7, 13–17]. Много исследований посвящено изучению различных систем защиты клеток растений от абиотических стрессов. Это, прежде всего, такие системы как антиоксидантная и шаперонная системы клетки. Однако мало известно как взаимодействуют эти системы друг с другом в нормальных и в стрессовых условиях [7].

Представители семейства *Cucurbitaceae* являются широко распространенными важными пищевыми культурами, которые обладают рядом ценных свойств и служат необходимым источником витаминов и минеральных веществ [18, 19]. Известно, что растения тыквы отличаются повышенной устойчивостью к засухе (тепловой стресс и обезвоживание). Возможно, что более устойчивые к тепловому стрессу генотипы обладают более развитыми системами антиоксидантной и шаперонной защиты от стрессового воздействия. Гипотеза основана на предположении, что генети-

ческая предрасположенность играет ключевую роль в процессах клеточной защиты, которые включают шаперонную и антиоксидантную системы, а также и связанные с ними многочисленные сигнальные пути. Представляло интерес изучить защитные механизмы клетки: шаперонную и антиоксидантную системы и их взаимовлияние в условиях теплового стресса у генотипов *Cucurbitaceae*, различающихся по устойчивости к тепловому стрессу, а также оценить возможность использования этих белков в качестве индикаторов окислительного стресса и устойчивости растений к окислительному стрессу.

Цель настоящей работы — изучение взаимодействия двух защитных систем клетки: антиоксидантной (на примере SOD и CAT) и шаперонной систем (на примере цитоплазматического белка HSP70 и белка хлоропластов HSP70B) при тепловом стрессе в клетках трех генотипов семейства *Cucurbita* — *C. maxima* Duchesne, *C. pepo* L. и *C. moschata* Duchesne, различающихся по устойчивости к стрессам окружающей среды.

МЕТОДИКА

Объект исследования. В работе использовали три вида *Cucurbitaceae*, наиболее распространенных на территории России — крупноплодная (*Cucurbita maxima* Duchesne) сорт Мраморная, твердокожая (*Cucurbita pepo* L.) сорт Кустовая оранжевая и мускатная (*Cucurbita moschata* Duchesne) сорт Витаминная. Представители семейства *Cucurbitaceae* в качестве объекта исследования были выбраны потому, что три указанных выше генотипа имели различную устойчивость к неблагоприятным условиям [20]. *C. maxima* и *C. pepo* характеризовались большей устойчивостью к неблагоприятным условиям, особенно тепловому стрессу, чем *C. moschata*.

Растения выращивали в климатической камере в следующих условиях освещения: 16 ч свет/8 ч ночь при 25°C в дневное время и 16°C в ночное. Молодые 14-дневные растения тыквы делили на две группы: 1) растения продолжали выращивать в нормальных благоприятных для роста условиях; 2) растения подвергали воздействию теплового стресса при 38°C в течение 2 ч. После обработки листья собирали и использовали для анализа или хранили при –80°C до выделения препаратов белка.

Выделение суммарного белка. Листья растений замораживали в жидком азоте и растирали в ступке. Затем к навеске 100 мг гомогенизированных листьев добавляли 1 мл 0.01 М К-фосфатный буфера, рН 7.4, содержащего 1 мМ ЭДТА, и перемешивали. Гомогенат оставляли во льду на 10 мин и затем центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость использовали для определения концентрации белка и активности ферментов.

Содержание белка определяли по методу Бредфорда [21], используя в качестве стандарта бычий сыроточный альбумин.

Определение активности каталазы (CAT; КФ 1.11.1.6). CAT эффективно и специфично разлагает пероксид водорода и защищает клетки от его токсического воздействия. CAT превращает две молекулы пероксида водорода в воду и кислород. CAT обнаруживается главным образом в пероксисомах, хлоропластах, митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме [1].

Для измерения активности изоферментов CAT использованы наборы Metabolism Assay Kit ("Elabscience Biotechnology", США) для определения активности CAT. Определение активности и расчеты проводили согласно протоколу производителя набора. Реакцию, при которой каталаза разлагала пероксид водорода, останавливали добавлением молибдата аммония. Оставшийся после действия каталазы пероксид водорода реагировал с молибдатом аммония с образованием желтоватого комплекса. Активность CAT рассчитывали по образованию желтоватого комплекса, ОП которого измеряли при 405 нм. За единицу активности CAT (U) принимали такое количество фермента, которое разрушает 1 мкмоль H_2O_2 в минуту при 37°C.

Определение активности супероксиддисмутазы (SOD; КФ 1.15.1.1). SOD является металлоферментом и одним из наиболее эффективных компонентов антиоксидантной системы защиты растительной клетки от токсического действия АФК [1]. SOD защищает клетки от избытка супероксида. Под действием SOD два супероксидных аниона превращаются в кислород и пероксид водорода: $2O_2^{2-} + 2H^+ = O_2 + H_2O_2$. Самая распространенная в клетке и доминирующая форма фермента — CuZn-SOD. Измерение общей активности SOD (T-SOD) и активности CuZn-SOD, а также Fe-SOD и Mn-SOD проводили с помощью набора Metabolism Assay Kit ("Elabscience", США). Определение активности и расчеты проводили согласно протоколу производителя набора. Для обнаружения активности всех изоформ SOD использовали систему ксантин и ксантиноксидаза, продуцирующую супероксидный анион, который окислял гидроксиламин с образованием нитрита пурпурно-красного цвета (согласно протоколу). SOD в образцах оказывал ингибирующий эффект на супероксидный анион и таким образом ингибировал образование нитрита. За единицу ферментативной активности SOD (U) принимали уровень активности фермента, необходимый для 50%-ного ингибирования реакционной системы, содержащей 1 мг белка образца. Активность SOD рассчитывали по образованию пурпурно-красного нитрита, измеряемого при 550 нм.

Сумма активностей трех изоформ SOD (CuZn-SOD, Fe-SOD и Mn-SOD) в клетках растений дает общую активность T-SOD. Активность CuZn-SOD в образцах определяли после предобработки согласно протоколу производителя набора, которая блокировала активность Fe-SOD и Mn-SOD. Активность изоферментов Fe-SOD и Mn-SOD рассчитывали как разницу активностей T-SOD — CuZn-SOD.

Анализ уровней белков теплового шока цитоплазмы HSP70 хлоропластов HSP70B. Уровень белков теплового шока (HSP) определяли с помощью гель-электрофореза и вестерн-блоттинга [22]. Листья растирали с жидким азотом и к 100 мг гомогенизированных листьев добавляли буфер (1 : 3), содержащий ДДС-Na (2% ДДС-Na, 100 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 20% сахарозы и 2% меркаптоэтанола). Гомогенат центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин, супернатант использовали для определения белка и проведения электрофореза в ПААГ.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [21]. Аликвоты по 20 мкг белка наносили на дорожки и фракционировали в 12.5%-ном — ПААГ с Na-ДДС. О равном нанесении препаратов белков (20 мкг) судили по окрашиванию Кумасси R-250.

Вестерн-блоттинг. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в камере для блоттинга в буфере для переноса (25 мМ Tris, 250 мМ глицин, 20%-ный этанол и 0.02%-ный ДДС-Na, pH 7.5) в течение 1 ч при 200 мА. Затем мембрану с перенесенными белками помещали на 1 ч при 4°C в (блокирующий) 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7.5, содержащий 200 мМ NaCl, 0.1%-ный твин 20 (TBST) и 5%-ное сухое обезжиренное молоко, после чего добавляли первичные поликлональные антитела кролика против HSP70 цитоплазмы ("Agrisera", Швеция) и HSP70B хлоропластов (любезно предоставленные проф. М. Шрода. Университет г. Кайзерслейтерн, Германия). Мембрану инкубировали с антителами при постоянном перемешивании в течение ночи при 4°C. В качестве вторичных антител использовали антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10000) ("Agrisera", Швеция). Каждый этап сопровождали многократным промыванием мембран буфером TBST. Иммунные комплексы на мембране выявляли с помощью флуоресцентной системы детекции ECL ("GE Healthcare", Великобритания), сигналы регистрировали на рентгеновскую пленку ("Retina", Германия). Пленку сканировали, данные обрабатывали с помощью программы ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Опыты повторяли по крайней мере три раза на независимо выращенных растениях. Статистический анализ проводили с помощью t-теста Стьюдента.

дента, используя Microsoft Office Excel 2003 или однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вопрос о том, как взаимодействуют две основные защитные системы клетки — антиоксидантная ферментная система и шаперонная система клетки в физиологических условиях и в стрессовых условиях постоянно привлекает внимание исследователей [10, 7]. Для изучения этого взаимодействия использовали два основных фермента антиоксидантной системы клетки — CAT и SOD и важнейшие белки шаперонной системы — белки теплового шока семейства HSP70 — HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов.

Реакция антиоксидантных ферментов на тепловой стресс у генотипов *Cucurbitaceae*. На рис. 1 представлены результаты изучения действия теплового стресса на удельную активность CAT у трех генотипов *Cucurbitaceae*, различающихся по устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды (*C. maxima* Duchesne $\geq$ *C. pepo* L. $>$ *C. moschata*, Duchesne).

Как следует из рис. 1 в физиологических условиях (контроль) уровень активности CAT выше у генотипов *C. pepo* и *C. maxima*, чем у генотипа *C. moschata* на 25–30%.

Под действием теплового стресса у всех изученных генотипов уровень активности CAT повышался по сравнению с контролем. Увеличение уровня активности CAT у *C. moschata* составляло 29% по сравнению с контролем, в то время как повышение уровней активности у *C. pepo* и *C. maxima* составляло 5–6%.

Таким образом, у генотипов *C. pepo* и *C. maxima* по сравнению с *C. moschata* обнаружены более высокие уровни активности CAT как в контроле, так и после теплового стресса. По-видимому, это связано с большей устойчивостью к стрессу генотипов *C. pepo* и *C. maxima* по сравнению с *C. moschata*. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными работами, в которых показано, что уровень активности CAT выше у устойчивых к стрессу растений [23, 10, 6, 3]. Однако в ряде публикаций приводятся противоречивые данные. Так было показано, что при засухе увеличивается активность CAT пшеницы, а уровень активности CAT был выше у особенно чувствительных к стрессу генотипов [24]. В другом исследовании сообщалось о снижении активности CAT в проростках риса после засухи [25] или отсутствии корреляции уровней активности CAT с устойчивостью растений к тепловому стрессу [6]. Таким образом, в литературе имеются противоречивые данные о CAT как индикаторе устойчивости к окислительному стрессу. Учитывая эту информацию, в настоящее время вопрос о связи между уровнем активности

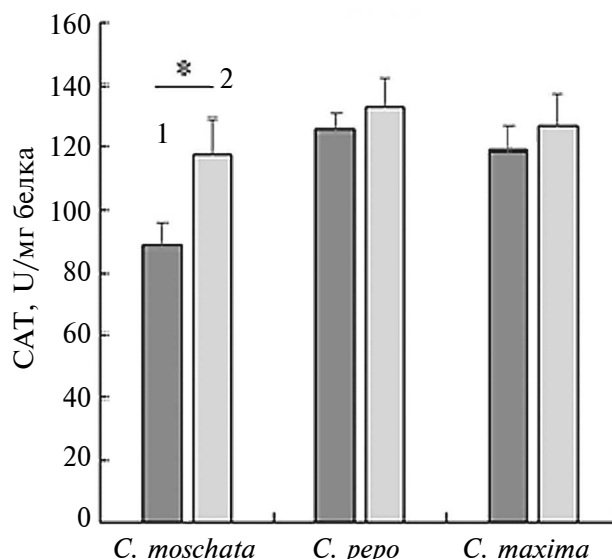


Рис. 1. Активность каталазы в листьях растений трех генотипов *Cucurbitaceae* после теплового стресса: 1 — контроль, 2 — 38°C. * — обозначены статистически значимые различия ($p < 0.05$).

CAT и устойчивостью генотипа к тепловому стрессу остается открытым и нуждается в дальнейшем исследовании.

На рис. 2 представлены изменения уровней удельной активности SOD после теплового стресса у трех генотипов *Cucurbitaceae*. SOD подразделяют на изоферменты на основании присутствия кофакторов металлов (Cu/Zn/Mn/Fe) в активном центре [1]. На основании их локализации в клетке, структуры и функций в растениях различают три вида SOD: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD и Fe-SOD. Cu/Zn-SOD обнаружена в цитозоле, хлоропластах и пероксисомах. Mn-SOD в основном находится в митохондриях, но также и в пероксисомах и апопластах. Fe-SOD обнаружена в хлоропластах и в меньшей степени в пероксисомах и апопластах. Все изоформы SOD кодируются ядерным геномом. Показано, что Mn-SOD и Fe-SOD встречаются как у прокариот, так и у эукариот, тогда как Cu/Zn-SOD встречается в основном у эукариот [1].

У генотипов *C. moschata* обнаружен самый высокий конститутивный уровень активности суммарной T-SOD в контроле по сравнению с двумя другими генотипами (рис. 2а). В ответ на тепловой стресс показано небольшое падение уровня T-SOD у *C. moschata* и небольшое увеличение у *C. maxima*. Только у *C. pepo* выявлено увеличение уровня активности на 21% (рис. 2а) после стресса. Таким образом, увеличение активности T-SOD наблюдалось у двух генотипов *C. pepo* и *C. maxima*, что свидетельствовало об их более высокой устойчивости к тепловому стрессу по сравнению с *C. maxima*.

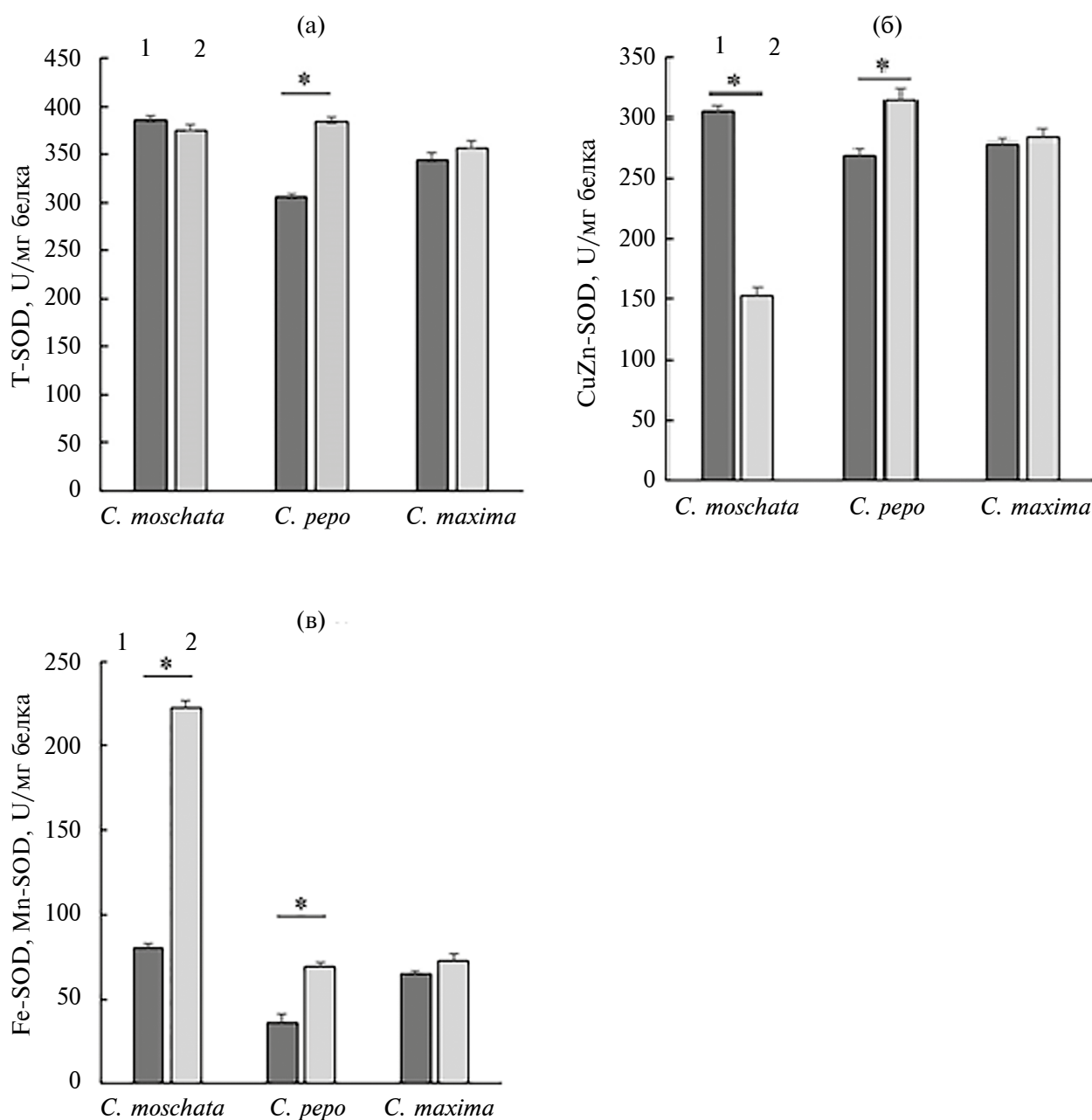


Рис. 2. Активность суммарная T-SOD (а), а также CuZn-SOD (б) и Fe-SOD, Mn-SOD (в) в листьях растений трех генотипов *Cucurbitaceae* после теплового стресса: 1 — контроль, 2 — 38°C. * — обозначены статистически значимые различия ($p < 0.05$).

Самая распространенная и доминирующая форма фермента SOD в клетке — CuZn-SOD [1]. Как следует из результатов, представленных на рис. 2б выявлены заметные различия при сравнении уровней активности CuZn-SOD у трех генотипов *Cucurbitaceae*. После теплового стресса показано заметное падение уровня активности CuZn-SOD у *C. moschata* по сравнению с двумя другими генотипами. Так, обнаружено, что уровень

активности CuZn-SOD у *C. moschata* уменьшился при тепловом стрессе на 49.8%. В то время как активность CuZn-SOD *C. pepo* возрастала на 14.6%, а активность CuZn-SOD *C. maxima* на 2%. После действия теплового стресса уровень активности CuZn-SOD в листьях *C. pepo* и *C. maxima* был выше, чем у *C. moschata*, что указывало на большую устойчивость генотипов к окислительному стрессу. Наши результаты совпадали с ранее полученными

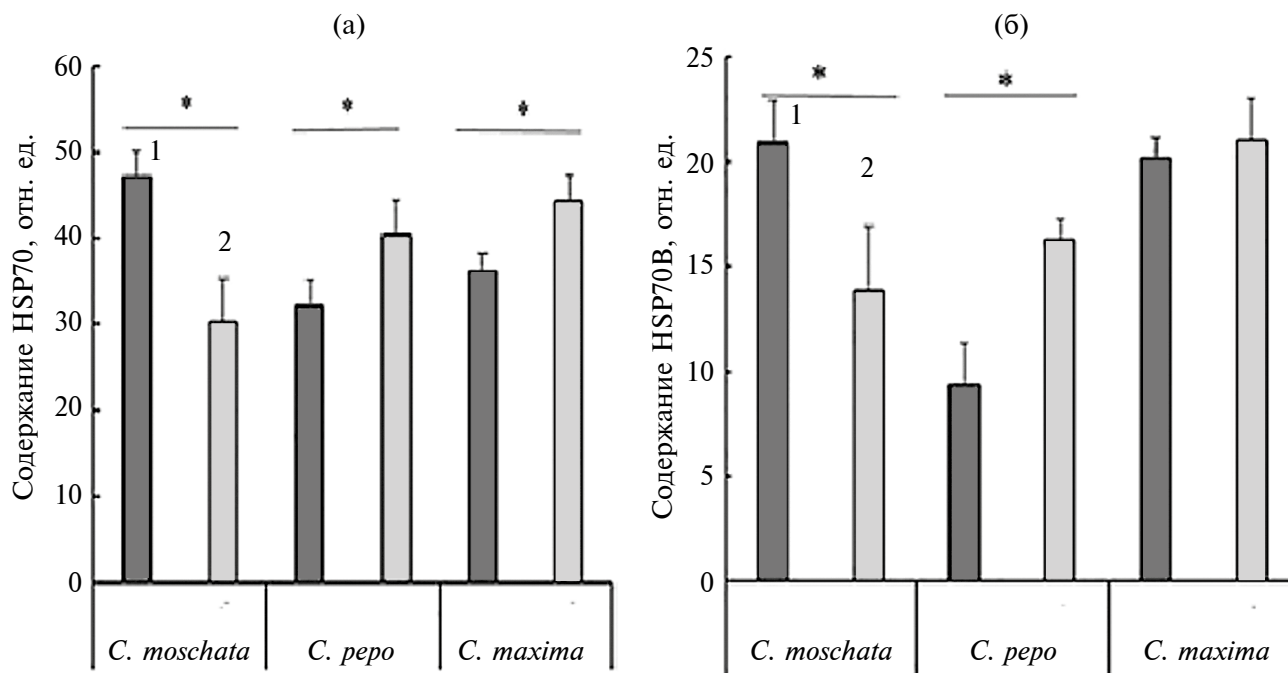


Рис. 3. Изменение уровней белков теплового шока HSP70 цитоплазмы (а) и HSP70B хлоропластов (б) у трех генотипов *Cucurbitaceae* после теплового стресса (2) или без стресса, контроль (1). * — обозначены статистически значимые различия ($p < 0.05$).

и показали, что у устойчивых к стрессу растений уровень активности CuZn-SOD выше, чем у чувствительных к стрессу растений [26].

У всех изученных генотипов *Cucurbitaceae* обнаружено увеличение уровня активности Fe-SOD и Mn-SOD (рис. 2в). Наибольшее увеличение удельной активности Fe-SOD и Mn-SOD выявлено у *C. moschata* (64%). Для генотипов *C. pepo* и *C. maxima* показано увеличение уровней активности Mn-SOD на 47 и 12% соответственно. По-видимому, повышение уровня активности этих изоформ SOD у *C. moschata* компенсировало падение уровня активности основного представителя фермента в клетке — CuZn-SOD при тепловом стрессе.

Белки теплового шока. Влияние теплового стресса на уровень цитоплазматических HSP70 и хлоропластных шаперонов HSP70B у генотипов *Cucurbitaceae*, различающихся по устойчивости к стрессу, представлено на рис. 3. Показано, что конститутивные уровни белков зависят от генотипа. Наивысший конститутивный уровень HSP70 цитоплазмы обнаружен у *C. moschata* (рис. 3а). Для двух других генотипов выявлены более низкие конститутивные уровни белков теплового шока. Сходная динамика изменений конститутивных уровней белков теплового шока HSP70B хлоропластов (рис. 3б) получена у трех генотипов *Cucurbitaceae* после теплового стресса.

Обнаружено что уровень белков HSP70 цитоплазмы уменьшался на 36, а HSP70B хлоропла-

стов на 34% в клетках растений *C. moschata* после действия теплового стресса. Напротив, уровень белков теплового шока HSP70 цитоплазмы увеличивался у генотипов *C. pepo* и *C. maxima* на 20 и 18% соответственно, а в случае с белками HSP70B хлоропластов увеличение составляло 43 и 10% соответственно. Следует отметить, что динамика изменений уровней как шаперонов цитоплазмы, так и шаперонов хлоропластов при тепловом стрессе аналогичная.

Повышенный уровень HSP70 у двух генотипов *C. pepo* и *C. maxima* свидетельствовал о способности этих растений активно переносить тепловой стресс и выживать в стрессовых условиях. При сравнении реакции HSP70 трех генотипов на тепловой стресс отмечено, что накопление HSP зависит от генотипа (рис. 3). Согласно ранее опубликованным данным [13–17], более высокие уровни белков теплового шока у генотипов *C. pepo* и *C. maxima* после действия стресса предполагают более высокую устойчивость к стрессу по сравнению с генотипом *C. moschata*.

При сравнении уровней белков теплового шока и уровней активностей SOD при тепловом стрессе у *C. moschata* обнаружено снижение уровней активности CuZn-SOD, что совпадало также с уменьшением уровней белков HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов. В тоже время у двух генотипов *C. pepo* и *C. maxima* наблюдалось увеличение уровня активности фермента и уровней шаперонов. Иными словами, эти результаты говорят о том,

что реакция на стресс в значительной степени зависела от генотипа. Падение уровней шаперонов и антиоксидантных ферментов после стрессового воздействия свидетельствовало о меньшей устойчивости к стрессу у *C. moschata* по сравнению с двумя другими генотипами.

Таким образом, белки теплового шока (HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов) и антиоксидантные ферменты (CAT и SOD) участвуют в стрессовом ответе на тепловой стресс у трех генотипов *Cucurbitaceae* с различной устойчивостью к стрессу. Из сравнительного анализа следует, что тепловой стресс оказывал негативное влияние и вызывал окислительный стресс у всех трех генотипов *Cucurbitaceae*. В результате у генотипа *C. moschata* уменьшался уровень активности SOD по сравнению с контрольными значениями активности. Напротив, у генотипов *C. pepo* и *C. maxima* активируются антиоксидантные ферменты, вовлеченные в детоксификацию АФК. Показана положительная корреляция (рис. 2 и 3) уровней активности CuZn-SOD (основного представителя фермента в клетке) с уровнями шаперонов у трех видов *Cucurbitaceae*. Антиоксидантная система и шаперонная системы клетки взаимодействуют для защиты клеток растений от теплового стресса.

Как взаимодействуют эти защитные системы на молекулярном уровне? Как представлено на схеме рис. 4 одним из вариантов взаимодействия

этих систем является шаперонная активность HSP, защищающая антиоксидантные ферменты (например, CAT и SOD) от повреждающего действия АФК,

Белки теплового шока сохраняли и восстанавливали конформацию и активность антиоксидантных ферментов, что приводило к снижению концентрации АФК и смягчению повреждения фотосистемы-2, что и обеспечивало устойчивость к тепловому стрессу [27, 28]. Другой путь взаимодействия этих двух основных клеточных систем защиты от окислительного стресса осуществлялся на уровне регуляции экспрессии генов этих белков. В физиологических условиях транскрипционный фактор HSF1 не активен и связан с комплексом белков теплового шока HSP90 и HSP70 и кошаперонами. При тепловом стрессе образуются поврежденные ферменты (денатурация, агрегация и др.), которые связываются с HSP70 и HSP90. При этом освобождается фактор транскрипции HSF1, который образует активные тримеры. Тримеры фактора транскрипции связываются с HSE-элементами промоторной области генов, чувствительных к тепловому стрессу. Фактор HSF1 является мастер-регулятором термотолерантности растений [29]. Таким образом, запускается транскрипция белков теплового шока и других факторов транскрипции, необходимых для синтеза ферментов антиоксидантной защиты. Однако для представления прямых доказательств влияния HSP70 на регу-

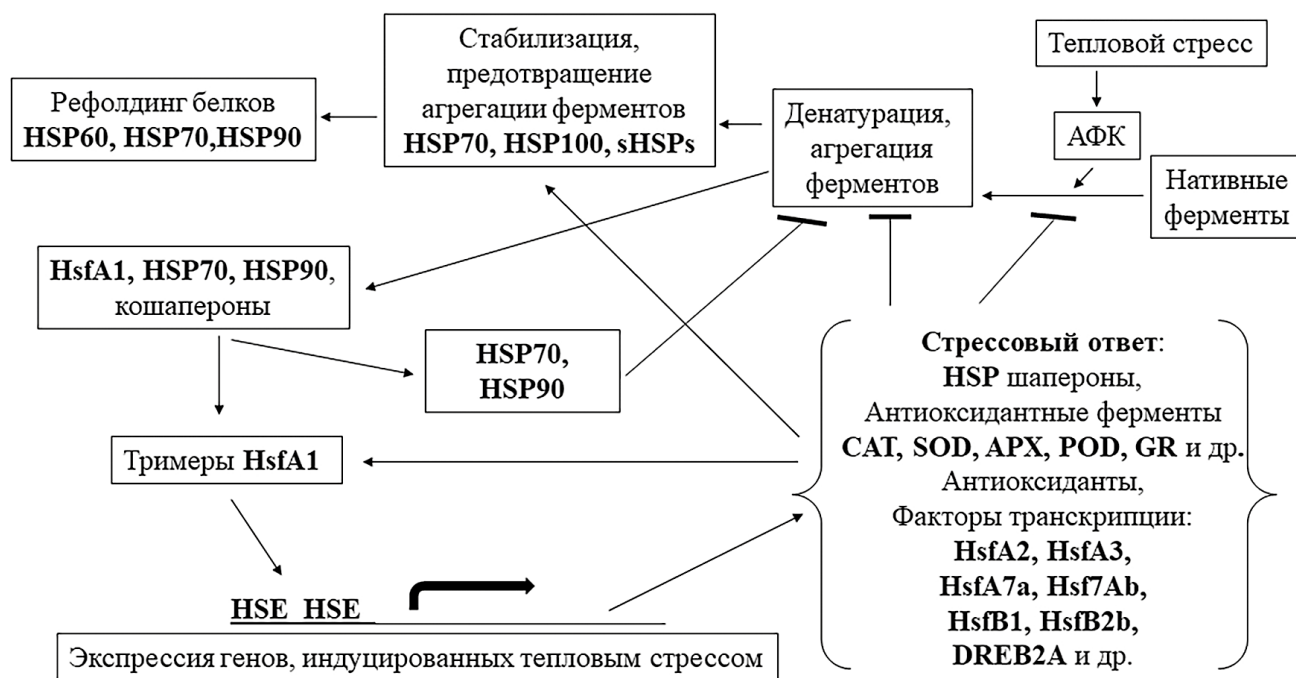


Рис. 4. Схема взаимодействия шаперонной и антиоксидантной ферментной системы, участвующих в стрессовом ответе на тепловой стресс. HSE (Heat Shock Elements) — элементы теплового шока в промоторных областях генов, регулируемых транскрипционными факторами Hsf; CAT — каталаза; SOD — супероксиддисмутаза; POD — пероксидаза; APX — аскорбатпероксидаза; GR — глутатионредуктаза.

ляцию ферментов антиоксидантной защиты, необходимы дальнейшие исследования этих процессов.

Кроме того, гормоны, такие как абсцизовая кислота (ABA) и многофункциональные сигнальные молекулы, такие как мелатонин, регулируют активность SOD, как и других антиоксидантных ферментов, контролируя экспрессию генов [1]. По-видимому, существуют перекрестные взаимодействия между сигнальными сетями АФК и гормонами в ответ на тепловой стресс. При тепловом стрессе ABA активирует факторы транскрипции AREB/ABF, контролирующие ABA-зависимую экспрессию генов [1].

Биоинформатический анализ семейств генов белков теплового шока полностью секвенированных геномов растений выявил избыточное количество генов HSP70 (18–114) у высших растений, в отличие от других организмов [10, 30–32]. Считается, что эти гены образовались в результате дупликации. Функции этих избыточных генов HSP70 еще предстоит изучить. По-видимому, растения, как организмы, не способные двигаться и избегать стресса, выработали защитные механизмы для выживания или адаптации к стрессовым условиям. Анализ генов SOD также выявил избыточное число генов фермента. Так, в геноме кукурузы обнаружено 13 генов SOD [33]. Таким образом, гены HSP и SOD, лежащие в основе устойчивости генотипа к стрессам, более многочисленны, разнообразны и изменчивы, чем считалось ранее, особенно в отношении разнообразия их регуляции.

Анализ данных, полученных при изучении активности антиоксидантных ферментов, показал связь с данными, полученными при анализе транскрипции генов этих ферментов [7, 9]. Показано, что активность антиоксидантных ферментов и связанная с ними экспрессия генов были выше у сортов тыквы с высокой устойчивостью к стрессу, чем у сорта с низкой устойчивостью [9]. Результаты, полученные при изучении экспрессии генов, также свидетельствуют о том, что гены антиоксидантных белков и гены шаперонов тесно взаимодействуют между собой при стрессовом воздействии.

Таким образом, согласно генетическим и геномным исследованиям, гены белков теплового шока и гены антиоксидантов тесно взаимодействуют в ответе растений на стресс [7]. Анализ транскриптомного массива данных выявил тесную взаимосвязь между генами белков теплового шока и генами антиоксидантных ферментов, что указывает на связь между конкретными генами и функцией их предполагаемых партнеров [7]. Эти результаты значительно расширили наше понимание роли шаперонов HSP и антиоксидантных генов, участвующих в реакции на абиотический стресс.

Особый интерес представляет изучение белков теплового шока как индикаторов окислительного

стресса, вызванного тепловым стрессом [12, 34]. Ранее были получены результаты, указывающие на то, что уровни хлоропластного белка HSP70B являются хорошими индикаторами окислительного стресса в клетках зеленых водорослей [22]. Была получена хорошо выраженная связь между устойчивостью штаммов одноклеточных зеленых водорослей к стимулам окружающей среды и сверхпродукцией HSP70B.

Исследование уровней цитоплазматического белка-шаперона HSP70 как и хлоропластного HSP70B в генотипах *Cucurbitaceae* показало, что эти белки могут служить ранними маркерами окислительного стресса, вызванного тепловым стрессом, и их накопление в значительной степени зависит от генотипа. Это согласуется с гипотезой о том, что белки теплового шока семейства HSP70 являются одними из основных компонентов устойчивости к стрессу.

Результаты, полученные в работе, согласуются с ранее высказанными предположениями о том, что уровни активности SOD можно использовать в качестве возможных индикаторов быстрой оценки устойчивости к тепловому стрессу генотипов пшеницы. Предполагают, что активность антиоксидантных ферментов можно использовать в качестве индикатора оценки устойчивости к тепловому стрессу [6, 35, 36]. Таким образом, антиоксидантные ферменты, как и белки теплового шока семейства HSP70 могут быть использованы как ранние индикаторы окислительного стресса у растений.

В целом, мы отмечаем, что скоординированная антиоксидантная активность, связанная с повышенной активностью SOD и CAT, наряду с модуляцией уровней белков теплового шока, позволяет растениям *Cucurbitaceae* снизить вызванное тепловым стрессом окислительное повреждение. Шапероны HSP70 являются неотъемлемыми компонентами адаптивных стратегий, используемых растениями для преодоления неблагоприятных последствий теплового стресса и засухи. Уровни HSP70, HSP70B и уровни активности CuZn-SOD являются надежными ранними сигналами предупреждения теплового стресса, позволяя обнаружить стресс до того, как он нанесет серьезные повреждения растению. Установлено, что модуляция уровня активности CuZn-SOD (основного представителя фермента в клетке) и уровней шаперонов HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов у генотипов *Cucurbitaceae* скоординированы, что свидетельствует о взаимодействии этих двух защитных систем клетки при тепловом стрессе. Однако для разработки трансгенных культур и растений с повышенной устойчивостью к стрессам окружающей среды необходимы дальнейшие исследования на молекулярном уровне. Полученные результаты позволяют глубже понять молекулярные механизмы,

лежащие в основе стрессовых ответов фотосинтезирующих клеток, и могут быть использованы для дальнейшего изучения регуляции ответа на абиотические стрессы у растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23 24 00486).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mishra N., Jiang C., Chen L., Paul A., Chatterjee A., Shen G. // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14. 1110622. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1110622>
- Miller G., Suzuki N., Cifci-Yilmaz S., Mittler R. // *Plant, Cell & Environ.* 2010. V. 33. P. 453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Zandalinas S.I., Balfagón D., Arbona V., Gómez-Cadenas A. // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. 953. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00953>
- Katano K., Honda K., Suzuki N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. 3370. <https://doi.org/10.3390/ijms19113370>
- Arbona V., Hossain Z., López-Climent M.F., Pérez-Clemente R.M., Gómez-Cadenas A. // *Physiol. Plant.* 2008. V. 132. P. 452–466. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01029.x>
- Wang C., Wen D., Sun A., Han X., Zhang J., Wang Z., Yin Y. // *J. Cereal Sci.* 2014. V. 60. P. 635–659. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.05.004>
- Rahman M.A., Woo J.H., Song Y., Lee S.H., Hasan M.M., Azad M.A.K., Lee K.W. // *Life.* 2022. V. 12. 1426. <https://doi.org/10.3390/life12091426>
- Mishra P., Bhoomika K., Dubey R.S. // *Protoplasma.* 2013. V. 250. P. 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0365-3>
- Liu Z., Qiao D., Liu Z., Wang Z., Sun L., Li X. // *Peer J.* 2023. V. 11. e15177. <http://doi.org/10.7717/peerj.15177>
- Hu X., Liu R., Li Y., Wang W., Tai F., Xue R., Li C. // *Plant Growth Regul.* 2010. V. 60. P. 225–235. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9436-2>
- Юрина Н.П. // *Молекулярная биология.* 2023. Т. 57. С. 949–964. <https://doi.org/10.31857/S00 M26898423060228>
- Masand S., Yadav S.K. // *Mol. Biol. Rep.* 2016. V. 43. P. 53–64. <https://doi.org/10.1007/s11033-015-3938-y>
- Cho E.K., Hong C.B. // *Plant Cell Reports.* 2006. V. 25. P. 349–358. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0093-2>
- Song A., Zhu X., Chen F., Gao H., Jiang J., Chen S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. P. 5063–5078. <https://doi.org/10.3390/ijms15035063>
- Augustine S.M., Cherian A.V., Syamaladevi D.P., Subramonian N. // *Plant Cell Physiol.* 2015. V. 56. P. 2368–2380. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv142>
- Pulido P., Llamas E., Rodriguez-Concepcion M. // *Plant Signaling & Behavior.* 2017. V. 12. e1290039. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1290039>
- Devarajan A.K., Muthukrishnan G., Truu J., Truu M., Ostonen I., Kizhaeral S.S. et al. // *Plants.* 2021. V. 10. 387. <https://doi.org/10.3390/plants10020387>
- Mokhtar M., Bouamar S., Di Lorenzo A., Temporini C., Daglia M., Riaz A. // *Molecules.* 2021. V. 26. 3623. <https://doi.org/10.3390/molecules26123623>
- Vinayashree S., Vasu P. // *Food Chem.* 2021. V. 340. 128177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128177>
- Крыз Г. Овощеводство. Пер. с немецкого. М.: Колос, 2000. 572 с.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Chankova S., Mitrovska Z., Miteva D., Oleskina Y.P., Yurina N.P. // *Gene.* 2013. V. 516. P. 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.052>
- Gill S.S., Tuteja N. // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. P. 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Simova-Stoilova L., Vaseva I., Grigorova B., Demirevska K., Feller U. // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. P. 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.11.003>
- Sharma P., Dubey R.S. // *J. Plant Physiol.* 2005. V. 162. P. 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.09.011>
- Chen S., Liu A., Zhang S., Li C., Chang R., Liu D. // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. V. 73. P. 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.002>
- Driedonks N., Xu J., Peters J.L., Park S., Rieu I. // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. 999. <https://doi.org/10.1134/S0006297915100053>
- Fortunato S., Lasorella C., Dipierro N., Vita F., de Pinto M.C. // *Antioxidants.* 2023. V. 12. 605. <https://doi.org/10.3390/antiox12030605>
- Andrási N., Pettkó-Szandner A., Szabados L. // *J. Exp. Botany.* 2021. V. 72. P. 1558–1575. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa576>

30. Zhang L., Zhao H.K., Dong Q.L., Zhang Y.Y., Wang Y.M., Li H.Y. et al. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. 773.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00773>
31. Singh R.K., Jaishankar J., Muthamilarasan M., Shweta S., Dangi A., Prasad M. // Sci. Rep. 2016. V. 6. 32641.
<https://doi.org/10.1038/srep32641>
32. Kim T., Samraj S., Jiménez J., Gómez C., Liu T., Begcy K. // BMC Plant Biology. 2021. V. 21. P. 1–20.
<https://doi.org/10.1186/s12870-021-02959-x>
33. Liu J., Xu L., Shang J., Hu X., Yu H., Wu H., Lv W., Zhao Y. // Genet. Mol. Biol. 2021. V. 44. e20210035.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0035>
34. Davoudi M., Chen J., Lou Q. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. 1918.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031918>
35. Aina O., Bakare O., Fadaka A.O., Keyster M., Klein A. // Planta. 2024. V. 259. 60.
<http://doi.org/10.1007/s00425-024-04333-1>
36. Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuća K., & Jaćević V. // Front. Plant Sci. 2021. V. 11. 552969.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>

Modulation of Antioxidant Enzyme Activity Levels and Chaperone Levels in Different *Cucurbitaceae* Genotypes Under Heat Stress

N. P. Yurina^{a,*} and N. D. Murtazina^a

^a*Bakh Institute of Biochemistry, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: nyurina@inbi.ras.ru

Factors determining plant resistance to abiotic stress include many stress defense systems. The most significant of them are the antioxidant and chaperone systems. However, the mechanisms of interaction between these systems have not been sufficiently studied. In this work, we studied the effect of heat stress on the activity levels of antioxidant enzymes (superoxide dismutase; SOD and catalase; CAT) and the levels of heat shock proteins (cytoplasmic HSP70 and chloroplast HSP70B) in the leaves of pumpkin seedlings of three genotypes (*Cucurbita moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*) differing in their resistance to environmental stress. It was shown that under heat stress, the levels of CAT activity increased in all the studied genotypes. After heat stress, a noticeable drop (48.9%) in the level of CuZn-SOD activity was shown in *C. moschata*, compared with an increase in the enzyme activity by (2–14.6%) in the other two genotypes. The level of cytoplasmic HSP70 proteins decreased by 36, and chloroplast HSP70B by 34% in *C. moschata* plant cells after heat stress. In contrast, the level of cytoplasmic heat shock proteins HSP70 increased in *C. pepo* and *C. maxima* genotypes by 20 and 18%, respectively, and in the case of chloroplast HSP70B proteins, the increase was 43 and 10%. It was found that the modulation of the activity levels of CuZn-SOD (the main representative of the enzyme in the cell) and the levels of cytoplasmic HSP70 and chloroplast HSP70B chaperones in *Cucurbitaceae* genotypes is coordinated, indicating the interaction of these two cellular defense systems under heat stress. Thus, HSP70, HSP70B levels and CuZn-SOD activity levels are reliable early warning signals of heat stress, allowing the stress to be detected before it causes serious damage to the plant.

Keywords: *Cucurbitaceae*, antioxidant enzymes, heat shock proteins HSP70, heat stress