



ИЗМЕНЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В РАСТЕНИЯХ *BETA VULGARIS L.* ПРИ ОПОСРЕДОВАННОМ ВЛИЯНИИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ГЕНОМ

Р.В. Усачева, кандидат биологических наук
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»
e-mail: rima.usa@yandex.ru

Аннотация. Проведены исследования по опосредованному воздействию некоторых активных веществ на геном и их влиянию на углеводный обмен *Beta vulgaris L.* Исследование показало, что изменение активности ферментов углеводного обмена может повысить уровень сахаров в листьях сахарной свеклы.

Ключевые слова: сахарная свекла, *in vitro*, мелатонин, микроклоны, тепличные условия, сахаристость, концентрации, ферменты, углеводный обмен.

Одна из основных целей, которая преследуется при создании новых гибридов сахарной свеклы, — увеличение их сахаристости. Изучение экзогенного воздействия некоторых веществ, в том числе гормонов, влияющих на активизацию и ингибирование генов, участвующих в метаболизме сахара на молекулярном уровне, является актуальным направлением исследований. Данные литературных источников демонстрируют участие гена фруктокиназы MdFRK2 (ключевого фермента углеводного обмена) в индуцированном экзогенным мелатонином накоплении сахаров в растениях кукурузы [6], яблони [12], сахарного тростника [3], риса, томата [4, 5] и картофеля [2]. Мелатонин, опосредовано понижая экспрессию FRK2, гена, кодирующего фруктокиназу (FRK), значительно влияет на концентрацию сахаров. В растительных клетках она в большой степени регулируется их метаболизмом, который включает расщепление сахарозы инвертазой и сахарозосинтазой (SUSY), фосфорилирование образующихся гексоз и взаимопревращение гексозофосфатов и UDP-глюкозы, а также синтез сахарозы с помощью SPS и SPP [10]. У проростков кукурузы синтез и гидролиз сахарозы увеличивались в ответ на применение экзогенного мелатонина, что выразилось в повышенной экспрессии генов и ферментативной активности SPS и кислотной инвертазы [14]. Однако экспрессия FRK2, гена, кодирующего фруктокиназу (FRK), которая фосфорилирует фруктозу до фруктозо-

6-фосфата (F6P), снижается, особенно при высоких концентрациях мелатонина [6]. В результате фруктоза накапливается в клетках растения. Фруктокиназа является воротами к метаболизму фруктозы, а ортологи FRK2 — основными фосфорилирующими фруктозу высокоаффинными ферментами в томатах, рисе, кукурузе и картофеле [8]. Подавление ортологов FRK2 приводило к фенотипам, аналогичным фенотипам растений, обработанных высокими концентрациями мелатонина (повышенные концентрации сахара и замедленный рост). Например, подавление ортолога FRK2 (StFRK1) в картофеле способствовало повышению уровня сахаров (фруктозы, глюкозы, сахарозы) и снижению роста в надземной части растения. Результаты показали, что избыточная экспрессия MdFRK2 в яблоне снижала концентрацию фруктозы, глюкозы и сахарозы, а также то, что мелатонин регулирует накопление сахара и рост растений путем ингибирования экспрессии FRK2 [11].

Таким образом, накоплению сахаров в сахарной свекле может способствовать управление экспрессией генов, связанных с углеводным обменом. В литературе известны данные, что такие ферменты как сахарозофосфатсинтаза (SPS), а также сахарозосинтаза (SS) и инвертаза регулируются экзогенными гормонами БАП, ИУК, ГК, которые увеличивают активность ферментов в 2–3 раза [1]. В растениях сахарной свеклы влияние гормона мелатонина изучено только как антистрессовый фактор [7], влияющий на солеустойчивость растений. Исследование данного вопроса важно с точки зрения выявления механизмов действия генов, задействованных в обмене сахаров, и дальнейшей перспективы работы с данными генами методами геномного редактирования с целью увеличения сахаристости культуры.

Для экспериментов были отобраны селекционно-ценные генотипы сахарной свеклы MC 1290, MC 9047 и MC 9080 Рамонской селекции. Культивирование ми-

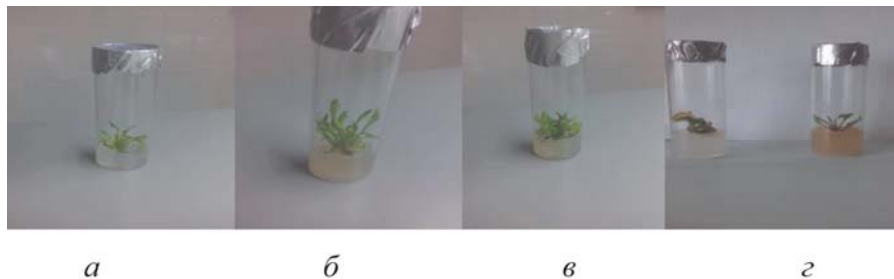


Рисунок 1. Культивирование регенератов сахарной свёклы *in vitro*: а – контроль; б – с мелатонином в концентрации 100 мкМ; в – с мелатонином в концентрации 500 мкМ; г – с мелатонином в концентрации 1000 и 5000 мкМ.



Рисунок 2. Внешний вид растений сахарной свёклы в теплице: а – контроль; б – с обработкой мелатонином

кроклонов *Beta vulgaris* L. осуществляли на питательной среде MS с добавлением мелатонина в концентрациях 100, 500, 1000 и 5000 мкМ в течение четырех недель в культуре *in vitro*. Параллельно с этим выращивали растения сахарной свёклы из семян в пластиковых вазонах с хорошим дренажем (12 x 12 см), которые заполняли почвой и торфом в теплице. Поддерживали температуру 23 °С и 14-часовой фотопериод. Через месяц были отобраны растения аналогичного роста и

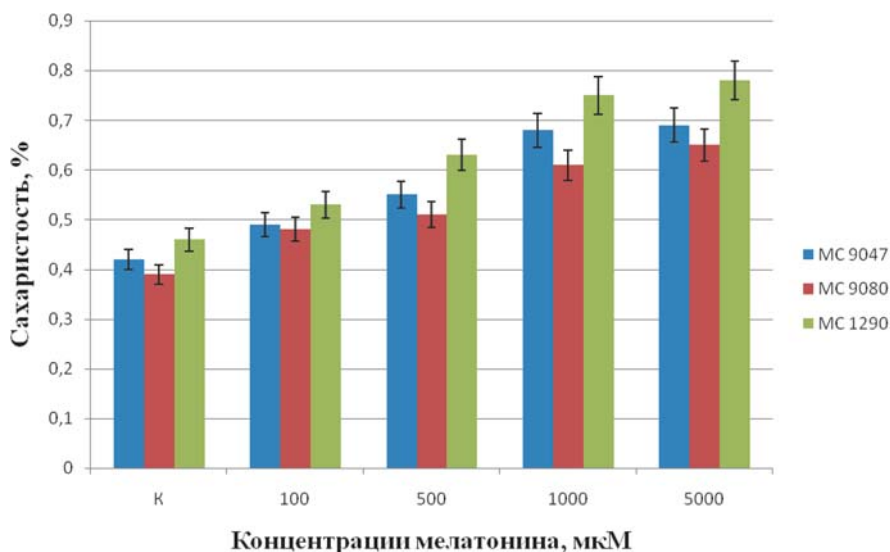


Рисунок 3. Средние показатели сахаристости у растений сахарной свёклы, выращенных в теплице, в %

размера для обработки экзогенным мелатонином. Контрольная группа получала по 30 мл воды каждые 3 дня. Для обработки использовали 30 мл раствора мелатонина в концентрациях 100, 500, 1000 и 5000 мкМ, который вносили в почву в каждый вазон раз в 3 дня в течение 14 суток. Для исследований брали надземную часть растений из теплицы для сравнения с микроклонами, культивируемыми на питательной среде MS *in vitro*. По каждой концентрации было испытано по 10 растений каждого генотипа.

Сахара экстрагировали 96 % этиловым спиртом. Количество общих сахаров измеряли на сахариметре марки Швабе АП-05 с погрешностью 0,05 °Z.

Активность фермента инвертазы и сахарозофосфатсинтазы измеряли на спектрофотометре марки СФ-104 при длине волны 340 нм с использованием фосфат-цитратного буфера. Активность фермента фруктокиназы определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм с применением трис- HCl буфера, АТФ, MgCl₂, дегидрогеназы G6P, NAD и фруктозы.

В ходе исследования было отмечено, что внесение мелатонина в питательную среду в низкой концентрации (100, 500 мкМ) не вызвало значительных фенотипических изменений в развитии регенератов (рис. 1 а, б, в); однако добавление мелатонина в высокой концентрации (1000 и 5000 мкМ) ингибировало рост микроклонов сахарной свёклы (рис. 1 г).

При обработке растений сахарной свёклы, выращенных в теплице в грунте, такого ингибирующего действия мелатонина не было отмечено. При всех используемых концентрациях растения росли и развивались на уровне с контролем (рис. 2).

Проведенными исследованиями выявлено, что концентрация сахаров в группе растений, получавшей мелатонин, была выше, чем в контрольной группе, получавшей воду (рис. 3).

Все исследуемые генотипы растений сахарной свёклы, выращенные в грунте, показали увеличение сахаристости с применением мелатонина: при концентрации 100 мкМ – в среднем в 1,2 раза; 500 мкМ – в 1,3 раза; 1000 мкМ – в 1,6 раза; 5000 мкМ – в 1,7 раза.

В генотипах микроклонов сахарной свёклы, выращенных в культуре *in vitro*, также отмечено увеличение сахаристости с применением мелатонина: при концентрации 100 мкМ

— в среднем в 1,12 раза, 500 мкМ — в 1,5 раза (рис. 4).

Применение концентраций мелатонина 1000 и 5000 мкМ ингибировало рост растений или приводило к их гибели.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов привели к выводу, что экзогенный мелатонин положительно влияет на накопление сахаров в листьях сахарной свеклы. Это, по данным литературных источников, связано с влиянием на экспрессию генов MdFRK2, SPS, SS, инвертазы. Сахара, накапливаясь в клетке, являются сигнальными молекулами, которые запускают механизм процессов, связанных с обменом и утилизацией этих сахаров [9]. Мелатонин ингибирует гены, участвовавшие в обмене сахаров и таким образом способствует накоплению их в клетке, что мы и наблюдали в проведенных опытах. Наиболее эффективной в повышении уровня сахаров являлась концентрация мелатонина 1000 и 5000 мкМ (в 1,6–1,7 раза) у растений, выращенных в грунте, и концентрация 500 мкМ (в 1,5 раза) для регенерантов в культуре тканей.

Для понимания регулирования мелатонином количества углеводов в листьях сахарной свеклы необходимо изучить влияние его на активность ферментов, участвующих в метаболизме сахара.

Анализ проведенных исследований выявил рост активности фермента инвертазы в листьях сахарной свеклы, получавшей раствор мелатонина, в среднем в 10 раз во всех трех генотипах (рис. 5). Это согласуется с результатами, полученными на других культурах, — мелатонин индуцирует как синтез, так и гидролиз сахарозы [5, 6].

Активность фермента фруктокиназа снизилась в 1,6 раза, по-видимому, из-за снижения экспрессии FRK [11] под воздействием мелатонина (рис. 6). И, как следствие, было отмечено увеличение количества сахаров в листьях сахарной свеклы.

Активность фермента сахарозофосфатсинтаза в листьях сахарной свеклы, получавшей раствор мелатонина, возросла в среднем в 1,5 раза, во всех гено-

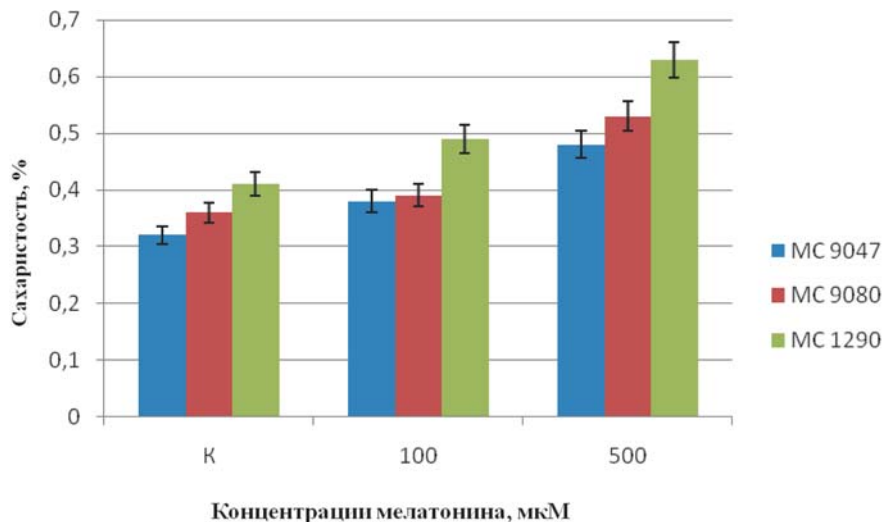


Рисунок 4. Средние показатели сахаристости у регенерантов в культуре in vitro, в %

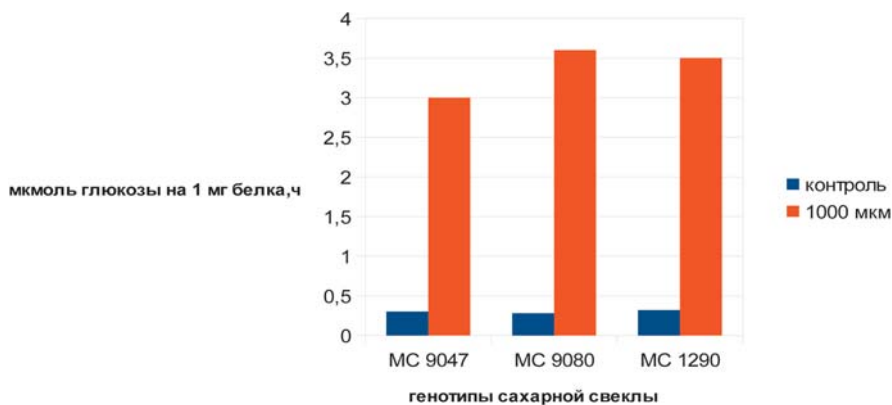


Рисунок 5. Активность фермента инвертазы в листьях сахарной свеклы с применением мелатонина в концентрации 1000 мкмоль

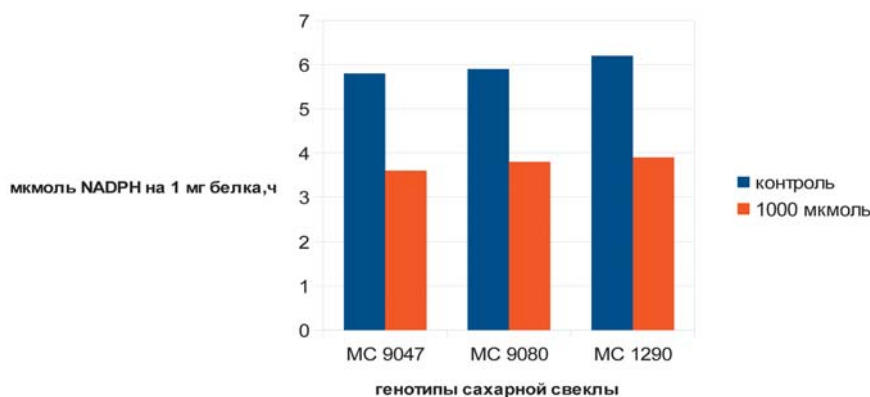


Рисунок 6. Активность фермента фруктокиназа в листьях сахарной свеклы с применением мелатонина в концентрации 1000 мкмоль

типах (рис. 7). Подобные результаты также получены на других растениях [6, 7, 8].

Результаты исследований других авторов [13] показали, что изменения углеводного обмена — активности сахарозофосфатсинтазы и инвертазы в том числе,

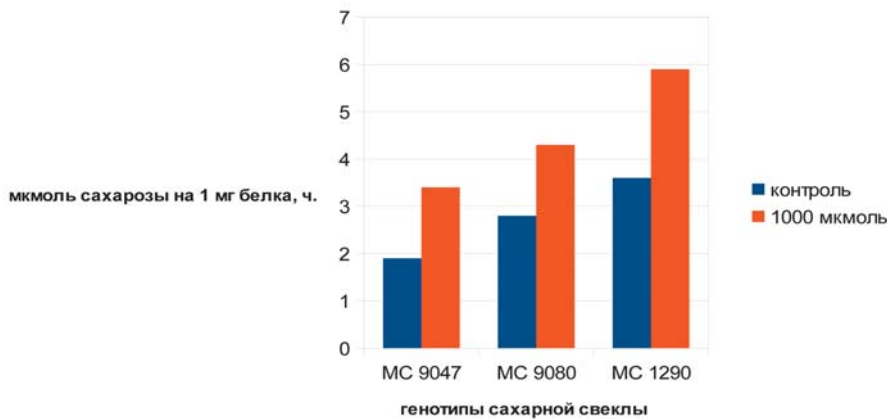


Рисунок 7. Активность фермента сахарозофосфатсинтаза в листьях сахарной свёклы с применением мелатонина в концентрации 1000 мкмоль

опосредованы также снижением экспрессии MdFRK2 в ответ на мелатонин. Так, ингибирование фосфорилирования фруктозы может ограничить поток углеводов в гликолиз и другие пути через фруктозо-6-фосфат (Ф6Р). Тогда у растений есть иные альтернативные подходы к увеличению потока углеводов в гликолиз – превращение сорбита во фруктозу посредством SDH-катализа, а также расщепление сахарозы SUSY или инвертазой и синтез сахарозы SPS [14].

Таким образом, выявленное нами увеличение сахаристости листьев сахарной свёклы при обработке растений мелатонином происходит за счет изменения активностей ферментов углеводного обмена – фруктокиназы, инвертазы и сахарозофосфатсинтазы, что, в свою очередь, обусловлено подавлением экспрессии генов MdFRK2.

Список использованной литературы

1. Сакало, В.Д. Гормональная регуляция активности сахарозофосфатсинтазы и сахарозосинтазы сахарной свёклы / В.Д. Сакало, В.М. Курчий // Физиология растений. - 2004. - Т. 51. - № 2. - С. 205-210.
2. Davies, H.V. Modulation of the fructokinase activity of potatoes (*Solanum tuberosum*) leads to significant shifts in the metabolism of tubers/ H.V. Davies, L.V. Shepherd, M.M. Burrell, F. Carrari, E. Urbanczyk-Wochniak, A. Leisse et al. // Physiology of plant cells. - 2005. - Vol. 46. - P. 1103-1115.
3. Chen, Y. Evolution and expression of the fructokinase gene family in sugar/ Y. Chen, Q. Zhang, H. Weichang, X. Zhang, L. Wang, X. Hua, Q. Yu, R. Ming & J. Zhang // Genomics. - 2017. - Vol. 18 BMC. - P. 197.
4. Jiang, H. Isolation and characterization of two fructokinase cDNA clones from rice / H. Jiang, W. Dian, F. Liu, P. Wu // Phytochemistry. - 2003. - No 62. - P. 47-52.
5. Kanayama, Y. Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato / Y. Kanayama, N. Dai, D. Granot, M. Petreikov, A. Schaffer, A. Bennett // Plant Physiol. - 2003. - No.113. - P. 1379-1384.
6. Zhao, H. Disclosure of the mechanism of action

of melatonin on the growth of corn seedlings: sugar metabolism as an example / H. Zhao, T. Su, L. Huo, H. Wei, Y. Jiang, L. Xu // J. Pineal Res. - 2015a. - Vol. 59. - P. 255-266.

7. Zhang, P. The beneficial effect of exogenous melatonin on overcoming salt stress in sugar beet (*Beta vulgaris L.*) / P., Zhang, L. Liu, X. Wang, Z. Wang, H. Zhang, J. Chen, X. Liu, Y. Wang, K. Li // Plants. - 2021. - No. 10. - P. 886.

8. Pego, J.V. Fructokinases of plants: a family gathering of sweet tooths / J.V. Pego, S.C. Smeekens // Trends Plant Sci. - 2000. - Vol. 5. - P. 531-536.

9. Rolland, F. Sugar sensitivity and signal transmission in plants: preserved and new mechanisms / F. Rolland F, E.

Baena-Gonzalez, J. Shin // Plant Biol. - 2006. - Vol. 57. - P. 675-709.

10. Rouen, Y.L. Sucrose metabolism: a gateway to the diverse use of carbon and sugar signaling / Yu. L. Ruan // Plant Biol. - 2014. - Vol. 65. - P. 33-67.

11. Yang, J. Melatonin-mediated sugar accumulation and growth inhibition in apple plants includes downregulation of expression and activity of fructokinase 2/ J. Yang, C.X. Zhang, Z.Y. Wang, S. Song, R. Zhang, Y. Zhao, B. Ma1 // Plant Science. - 2019. - Vol. 19

12. Wang, P. Melatonin regulates proteomic changes during leaf aging in malus .hupehensis / P. Wang, H. Sun, Y. Xie, M. Li, S. Zhang, D. Liang // Pineal Res. - 2015. - Vol. 57. - P. 291-307.

13. Janse, V.. Autophagy in plants: both the puppet and the puppet master of sugars / V. Janse, H.S. Rensburg, E.V. Den, S. Signorelli // Science of Plants. - 2019. - Vol. 10. - P. 14.

14. Zhao, H. Disclosure of the mechanism of action of melatonin on the growth of corn seedlings: sugar metabolism as an example / H. Zhao, T. Su, L. Huo, N. Wei, Y. Jiang, L. Xu // Pineal Res. - 2015a. - Vol. 59. - P. 255-266.

Changes in carbohydrate metabolism in *Beta vulgaris L.* plants with an indirect effect of some active substances on the genome

R.V. Usacheva

Summary. Studies have been conducted on the indirect effect of some active substances on the genome, and their effect on the carbohydrate metabolism of *Beta vulgaris L.* The study showed that a change in the activity of carbohydrate metabolism enzymes can increase the level of sugars in sugar beet.

Key words: sugar beet, in vitro, melatonin, microclones, greenhouse conditions, sugar content, concentrations, enzymes, carbohydrate metabolism.