

С. В. Кретинин, О. М. Бондаренко, В. С. Кравец,  
академик НАН Беларуси В. А. Хрипач,  
академик НАН Украины В. П. Кухарь

## Роль кальция в реализации биологического действия эпибрассинолида в метаболизме клеток трансгенных растений табака *сах1*

*Исследована роль кальция в реализации биологического действия экзогенного 24-эпибрассинолида (ЭБЛ) в метаболизме клеток трансгенных растений Nicotiana tabacum экотипа KY-160 и созданных на его основе трансгенных растений табака сах1, экспрессирующих кодирующую часть гена  $H^+/Ca^{2+}$  вакуолярного антипортера арабидопсиса SAХ1. Установлено, что ЭБЛ активизирует системы антиоксидантной защиты — супероксиддисмутазу, аскорбатпероксидазу и глутатионредуктазу, а также обуславливает повышение уровня супероксид анион-радикала и восстановленного глутатиона. Показано, что нарушение внутриклеточного гомеостаза ионов кальция приводит к снижению реакции растений на действие экзогенного ЭБЛ. При действии ингибитора глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижается активность ферментов глутатион-аскорбатного цикла — аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы.*

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, 24-эпибрассинолид, кальций, SAХ1 (Cation Exchanger 1), аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза, супероксиддисмутазы, НАД, НАДФ, НАДФН.

24-эпибрассинолид (ЭБЛ) относится к гормонам стероидной природы, которые вовлечены как в регуляцию ключевых этапов роста и развития растений, так и обеспечение устойчивости растений к ряду биотических и абиотических факторов внешней среды [1], связанных с развитием оксидативного стресса. ЭБЛ способен контролировать уровень активных форм кислорода (АФК), активируя системы антиоксидантной защиты, в том числе супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1), аскорбатпероксидазы (АПО; КФ 1.11.1.11), глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (ГР; КФ 1.8.1.7).

Тонкая регуляция уровня АФК в клетке является ключевым этапом в сигнализации АФК и предотвращении развития оксидативного стресса [2].

Адаптивные перестройки и изменения в метаболизме клеток растений в значительной степени опосредуются ионами кальция. Вероятно, кальций цитозоля клеток может служить связующим звеном для многих сигнальных путей, способствуя формированию сети трансдукции сигналов растительной клетки. Выявлено формирование всплеска цитозольного уровня кальция при действии брассиностероидов [3, 4]. В настоящей работе рассматривается влияние градиента  $Ca^{2+}$  в клетке на реакцию растений табака при действии экзогенного ЭБЛ.

**Материалы и методы.** *Объект исследования.* Для исследования использовали растения табака *Nicotiana tabacum* KY-160, а также трансгенные растения табака *сах1*, экспрессирующие кодирующую часть гена  $H^+/Ca^{2+}$  вакуолярного антипортера арабидопсиса SAХ1 (Cation Exchanger 1, At2g38170) [5].

Семена табака проращивали и доводили до возраста 4 недель на 1/2 питательного раствора Хогланда–Арнона в условиях гидропонной системы с еженедельной сменой питательного раствора. После этого у части вариантов, согласно схеме опыта, питательный раствор заменяли на 1/2 питательного раствора Хогланда–Арнона без кальция. Через неделю в соответствующие варианты опыта в питательный раствор добавляли ЭБЛ до конечной концентрации 1 мкМ. Листья растений табака этих вариантов опрыскивали раствором ЭБЛ 1 мкМ. По истечении суток часть растений отбирали на анализ активности ферментов, содержания пероксида водорода, общего белка и глутатиона. У оставшейся части растений питательный раствор с ЭБЛ заменяли на питательный раствор без гормона. На 6-й неделе после начала эксперимента растения пересаживали в почву и доводили до созревания семян.

Использованные реактивы: 24-ЭБЛ, синтезированный в лаборатории химии стероидов под руководством В. А. Хрипача в Институте биоорганической химии НАН Беларуси, краситель Кумасси G250 (“Loba Feinchemie”), нитросиний тетразолий (NBT) (“Sigma”), 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфобензил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид (ХТТ) (“Sigma”), НАДФН (“Merck”), 2-винилпиридин (“Aldrich”), ГР (“Sigma”), ДНТБ (“Sigma”), ЭГТА (“Merck”). Остальные реактивы были производства России и Украины квалификации “х. ч.”.

*Определение активности ферментов антиоксидантной системы.* Активность АПО определяли в реакционной смеси, содержащей фосфатный буфер, рН 7,0, 17 мМ раствор аскорбиновой кислоты, 5 мМ раствор Na-ЭДТА. К смеси добавляли растительный экстракт, 30 мкл 0,06% раствора пероксида водорода и проводили измерения при 290 нм.

Активность (ГР) определяли по изменению абсорбции реакционной смеси, при образовании окисленной формы НАДФН. Реакционная смесь содержала 50 мМ *трис*-НСl, рН 7,5, 3 мМ MgCl, 0,15 мМ НАДФН, 10 мМ окисленного глутатиона и 100 мкл растительного экстракта. Оптическую плотность измеряли при 340 нм.

Активность СОД определяли по способности ингибировать фотохимическое восстановление NBT. Реакционная смесь содержала 0,05% раствор NBT, 50 мМ K,Na-фосфатный буфер, 100 мкл растительного экстракта, 0,24% раствор Na-ЭДТА. Реакция запускалась добавлением 20 мкл 0,025% раствора рибофлавина. Пробирки перемешивали и выставляли на 10 мин под люминесцентную лампу TLD 36 W/54. Пробы анализировали на спектрофотометре СФ-46 при 560 нм. Контролем служили пробирки, находящиеся в темноте.

*Измерение генерации супероксид-радикала* выполняли спектрофотометрическим методом с использованием ХТТ. Акцептор электронов 0,2 мМ ХТТ в присутствии супероксида превращается в ХТТ формазан [6]. Измерение проводили в 50 мМ K-фосфатном буфере, рН 7,0. Оптическое поглощение формазана регистрировали спектрофотометрически ( $D = 470$  нм) через 30 мин после начала опыта.

*Определение уровня эндогенного пероксида.* Уровень эндогенного пероксида водорода определяли методом FOX с модификациям [7]. 500 мг ткани экстрагировали 5 мл 0,25 М серной кислоты. 1 мл раствора смешивали с 4 мл смеси, содержащей 1 мл 0,1 М сорбитола, 1 мл 0,25 М серной кислоты, 1 мл 1 мМ ксиленолового оранжевого, 1 мл 2,5 мМ соли Мора. Оптическую плотность окрашенного комплекса измеряли при 560 нм.

*Определение уровня восстановленного глутатиона (GSH).* Для определения уровня общего глутатиона использовали реакционную смесь, содержащую K,Na-фосфатный буфер, 0,15 мМ ЭДТА, 0,3 мМ 5,5-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) и 1,5 ед. акт. глутатионредуктазы. Реакцию инициировали добавлением 80 мкМ НАДФН и результат оценивали по изменению оптической плотности при 412 нм. Для определения количества окисленного глутатиона перед проведением анализа к растительному экстракту добавляли 2-винилпи-

ридин. Уровень GSH рассчитывали как разность между общим и окисленным глутатионом [8].

*Определение общего содержания белка.* Содержание белка определяли по методу Бредфорд. Кумасси G250 (50 мг) растворяли в 96% этаноле. Добавляли 50 мл 85%  $H_3PO_4$  и измеряли до 500 мл. Оптическую плотность окрашенного комплекса с белком определяли при 595 нм относительно чистого реагента.

*Определение общего содержания масла.* Экстракцию масла из измельченных семян табака проводили при 30 °C с использованием гексана в качестве растворителя при соотношении семя/растворитель 1/10 (масса/объем). Продолжительность экстракции — 24 ч при непрерывном помешивании. После завершения экстракции содержимое колб фильтровали под вакуумом и высушивали под вакуумом.

*Результаты и обсуждение.* Эндогенный уровень кальция в клетках различных видов растений не превышает 100 нМ. При изучении реакции растений на обработку экзогенными ЭБЛ наблюдали резкое возрастание цитозольного пула  $Ca^{2+}$  [3, 4]. Известно, что внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$  в процессе трансдукции сигналов может возрастать как за счет непосредственного поступления его в клетку, так и в результате мобилизации из внутриклеточных депо, например из вакуоли. Для блокирования обоих пулов кальция — внутриклеточного и внеклеточного, применялись два подхода: исключение кальция из питательной среды и использование трансгенных растений табака *sax1*, с гиперэкспрессией гена SAХ1 арабидопсиса, встроенного в геном клеток табака. SAХ антипортеры обеспечивают низкоаффинный транспорт цитозольных ионов  $Ca^{2+}$  в вакуоль. Растения табака *sax1* характеризуются быстрым истощением цитозольного пула ионов  $Ca^{2+}$ , при ограничении его притока, что обуславливает нарушение функций кальциевого сигналинга [5].

Результаты исследования влияния кальция и ЭБЛ (1 мкМ) на содержание субстратов и активность ферментов-антиоксидантов в клетках исходных и трансгенных растений табака приведены в табл. 1.

Образование  $O_2^{\bullet-}$  постоянно происходит в растительных клетках, прежде всего в результате взаимодействия кислорода с восстановленными компонентами электрон-транспортных цепей фотосинтеза и дыхания. Среди других ферментных систем особенного внимания

Таблица 1. Влияние кальция и ЭБЛ (1 мкМ) на содержание субстратов, активность ферментов-антиоксидантов и содержание восстановленного глутатиона в клетках исходных и трансгенных растений табака

| Параметр  | Растения                | Ca, 0 мМ                             | Ca, 2 мМ                             | Ca, 0 мМ +<br>+ ЭБЛ,<br>1 мкМ        | Ca, 2 мМ +<br>+ ЭБЛ,<br>1 мкМ        |
|---|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Супероксид-радикал<br>( $D = 470$ нм)                                 | Исх. тип<br><i>sax1</i> | $0,06 \pm 0,02$<br>$0,05 \pm 0,03$   | $0,04 \pm 0,03$<br>$0,04 \pm 0,02$   | $0,09 \pm 0,02$<br>$0,1 \pm 0,02$    | $0,12 \pm 0,02$<br>$0,11 \pm 0,03$   |
| Активность СОД, отн. ед.<br>активности/мг белка                       | Исх. тип<br><i>sax1</i> | $22,60 \pm 3,24$<br>$17,88 \pm 2,73$ | $30,99 \pm 1,24$<br>$18,97 \pm 3,98$ | $33,78 \pm 2,43$<br>$29,64 \pm 1,62$ | $42,19 \pm 4,75$<br>$33,36 \pm 4,42$ |
| Содержание $H_2O_2$ ,<br>мкМ/г сухой массы                            | Исх. тип<br><i>sax1</i> | $3,55 \pm 0,19$<br>$3,55 \pm 0,19$   | $3,69 \pm 0,11$<br>$3,55 \pm 0,19$   | $3,80 \pm 0,40$<br>$3,53 \pm 0,29$   | $2,81 \pm 0,34$<br>$3,44 \pm 0,20$   |
| Активность АПО, отн. ед.<br>активности/(мин <sup>-1</sup> · мг белка) | Исх. тип<br><i>sax1</i> | $4,77 \pm 0,80$<br>$4,70 \pm 1,37$   | $6,20 \pm 1,04$<br>$5,64 \pm 0,71$   | $7,30 \pm 0,20$<br>$7,15 \pm 0,43$   | $8,67 \pm 0,65$<br>$7,25 \pm 0,49$   |
| Содержание GSH,<br>мкМ/г сухой массы                                  | Исх. тип<br><i>sax1</i> | $4,07 \pm 0,52$<br>$3,77 \pm 0,24$   | $5,16 \pm 0,60$<br>$4,86 \pm 0,60$   | $5,16 \pm 0,60$<br>$5,16 \pm 0,60$   | $6,01 \pm 0,36$<br>$5,47 \pm 0,41$   |
| Активность ГР,<br>мМ/(мин <sup>-1</sup> · мг белка)                   | Исх. тип<br><i>sax1</i> | $2,28 \pm 0,09$<br>$2,17 \pm 0,43$   | $2,59 \pm 0,27$<br>$4,54 \pm 0,47$   | $3,41 \pm 0,60$<br>$2,40 \pm 0,34$   | $4,54 \pm 0,47$<br>$3,41 \pm 0,52$   |

заслуживают НАДФН-оксидазы плазматической мембраны, являющиеся кальцийзависимыми ферментами, играющими ключевую роль в регуляции метаболизма клеток [9].

Проведенные исследования выявили изменения в интенсивности новообразования супероксид анион-радикала у обработанных ЭБЛ и необработанных растений табака (см. табл. 1). После обработки растений ЭБЛ наблюдалось резкое повышение генерации супероксида, которое имело тенденцию к дальнейшему возрастанию при одновременном действии ЭБЛ и кальция. Увеличение продукции  $O_2^{\bullet-}$  приводило к активации СОД, для которой показана субстратная индукция. Можно видеть, что активность СОД после действия ЭБЛ (см. табл. 1) частично отражает динамику образования супероксид-радикала. В результате действия СОД образуется более стабильный молекулярный продукт — пероксид водорода, который из-за отсутствия в хлоропластах основного фермента его детоксикации — каталазы элиминируется в глутатион-аскорбатном цикле [10]. О работе этого цикла можно судить по активности его ключевых ферментов — АПО и ГР. Действие ЭБЛ вызвало достоверное уменьшение уровня пероксида водорода в варианте с 2 мМ кальция в питательном растворе. Активация АПО под влиянием ЭБЛ в целом повторяла картину с СОД. Скорость работы всего цикла определяет ГР, катализирующая реакцию восстановления окисленного димера глутатиона GSSG в GSH, который идет на пополнение пула восстановленного аскорбата и работу фермента детоксикации продуктов окисления — глутатионтрансферазы. Активность ГР при обработке ЭБЛ возросла почти в 1,5 раза по сравнению с контролем. Процесс был более выраженным при наличии кальция в питательном растворе.

Исследование закономерностей проявления биологических эффектов при комбинированных воздействиях может прояснить механизмы усиления или ослабления комбинации эффектов. В связи с этим в дальнейших экспериментах применялись трансгенные растения табака *sax1*. Анализ работы антиоксидантной системы у этих растений выявил, что скорость новообразования супероксид анион-радикала как у обработанных ЭБЛ, так и необработанных трансгенных растений табака имела значения, сходные с таковыми у растений исходного типа (см. табл. 1). Стимуляция защитных механизмов — активация СОД — у трансгенных растений табака *sax1* была ниже, чем у растений исходного типа. Активность ключевого фермента — аскорбатпероксидазы — также была ниже у растений табака *sax1*. Количество пероксида водорода при этом существенно не менялось. Активность ГР у растений табака *sax1* возрастала значительно меньше по сравнению с контролем. Действие ЭБЛ индуцировало синтез восстановленного глутатиона в меньшей степени, чем у растений исходного типа.

Об участии фитогормонов и ряда вторичных мессенджеров, в том числе брассиностероидов и свободного кальция, в регуляции уровня НАДФ/ НАДФН в метаболизме клеток растений информация крайне ограничена. В частности, показано, что стимуляция ионами кальция кальмодулинзависимой НАД-киназы [11] приводит к увеличению соотношения НАДФ/НАД. Установлена также активация ионами кальция ( $10^{-7}$  М) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД, КФ 1.1.1.49) [12]. С использованием генетических подходов на трансгенных растениях арабидопсиса со сниженной чувствительностью к брассиностероидам (*bri1*) выявлено участие НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.40) в опосредованной брассиностероидами регуляции клеточного роста [13].

Учитывая ключевую роль НАДФН во многих метаболических путях клеток разного уровня организации, особенно биосинтез жирных кислот и формирование триацидглицеридов в тканях растений, с одной стороны, а также его как компонент, обеспечивающий функционирование различных антиоксидантных систем, включая активацию глутатион-

редуктазы, несомненно актуальное значение приобретает поиск гормонов и их мишеней, обеспечивающих тонкую регуляцию обмена НАДФН в живых системах. Важное значение в анализе этих процессов принадлежит модуляции активности Г6ФД [14]. Среди возможных путей анализа функций указанного фермента используется воздействие  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , который обладает способностью связывать ионы кальция, при этом образуются малорастворимые фосфаты кальция. Так, при изучении роли кальция в кавитационных процессах в киселе растений фосфат натрия применялся для связывания  $\text{Ca}^{2+}$  наряду с ЭГТА и щавелевой кислотой [15]. В связи с этим нами в схему опыта был добавлен вариант с использованием ЭГТА.

Результаты ингибиторного анализа показали, что подавление активности фермента Г6ФД приводило к значительному снижению активности ферментов глутатион-аскорбатного цикла (табл. 2). Аналогичные результаты были получены при изучении действия блокирования активности Г6ФД с помощью  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  на активность ферментов антиоксидантов в клетках корней красной фасоли [14]. Наряду с этим использование ЭГТА также приводило к подавлению активности ферментов глутатион-аскорбатного цикла. Несмотря на то, что эффект ЭГТА был значительно ниже, чем  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , можно предположить, что некоторая доля в наблюдаемом эффекте опосредована связыванием кальция.

Способность ЭБЛ повышать продуктивность растений и содержание жиров в их тканях имеет важное значение для повышения продуктивности и максимальной реализации биологического потенциала растений и представляет несомненный интерес для практического решения задач возделывания масличных растений. Нами исследовано действие ЭБЛ на биологическую продуктивность исходных и трансгенных растений табака при различных уровнях кальция в питательном растворе в момент воздействия. Согласно результатам эксперимента (табл. 3), при достаточном уровне кальция в питательной среде трансгенные растения статистически не отличимы от исходных. При временном исключении кальция из питательной среды различия были намного существеннее. Так, средняя масса семян с растений исходного типа при наличии кальция в среде под воздействием ЭБЛ возрастала на 10%, а выход масла — на 16%. Для трансгенных растений в аналогичных условиях масса семян также возрастала на 10%, а количество масла с растения — на 35%. Временное исключение кальция из питательной среды у трансгенных растений при действии ЭБЛ приводило к снижению массы семян с растения на 21%, а количества масла — на 30% по сравнению с вариантами с достаточным уровнем кальция.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что интенсивность новообразования супероксид анион-радикала у обработанных ЭБЛ и необработанных растений табака существенно различалась. После обработки растений ЭБЛ наблюдалось рез-

Таблица 2. Влияние кальция, 24-эпибрассинолида, блокатора активности Г6ФД  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  и ЭГТА на активность ферментов глутатион-аскорбатного цикла в клетках исходных и трансгенных растений табака

| Параметр  | Растения | Ca, 0 мМ + ЭБЛ,                              | Ca, 2 мМ + ЭБЛ,                              | Ca, 0 мМ + ЭБЛ,       | Ca, 2 мМ + ЭБЛ,       |
|---|----------|--|--|-----------------------|-----------------------|
|   |          | 1 мкМ + $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,<br>2,5 мМ | 1 мкМ + $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,<br>2,5 мМ | 1 мкМ + ЭГТА,<br>5 мМ | 1 мкМ + ЭГТА,<br>5 мМ |
| Активность АПО,<br>отн. ед. активности/<br>(мин <sup>-1</sup> · мг белка) | Исх. тип | 2,36 ± 0,87                                  | 2,67 ± 0,65                                  | 3,68 ± 0,50           | 3,78 ± 0,36           |
|   | сах1     | 2,12 ± 0,73                                  | 2,14 ± 0,84                                  | 3,49 ± 0,21           | 3,51 ± 0,48           |
| Активность ГР,<br>мМ/(мин <sup>-1</sup> · мг белка)                       | Исх. тип | 1,75 ± 0,32                                  | 2,19 ± 0,08                                  | 2,42 ± 0,15           | 2,63 ± 0,12           |
|   | сах1     | 1,39 ± 0,21                                  | 1,52 ± 0,32                                  | 2,27 ± 0,13           | 2,42 ± 0,15           |

Таблица 3. Сравнение биологической продуктивности исходных и трансгенных растений табака под действием эбибрасинолида при различных уровнях кальция в питательном растворе в момент воздействия

| Параметр                            | Растения    | Ca, 0 мМ     | Ca, 2 мМ     | Ca, 0 мМ +<br>+ ЭБЛ,<br>1 мкМ | Ca, 2 мМ +<br>+ ЭБЛ,<br>1 мкМ |
|-------------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Количество семян<br>с растения, шт. | Исх. тип    | 61998 ± 5921 | 61151 ± 7643 | 62100 ± 5642                  | 65201 ± 4139                  |
|                                     | <i>sax1</i> | 62023 ± 6274 | 62508 ± 4878 | 59750 ± 6193                  | 63910 ± 7475                  |
| Масса семян с растения, г           | Исх. тип    | 4,60 ± 0,21  | 4,66 ± 0,40  | 4,74 ± 0,20                   | 5,12 ± 0,44                   |
|                                     | <i>sax1</i> | 4,14 ± 0,32  | 4,71 ± 0,32  | 4,10 ± 0,37                   | 5,19 ± 0,41                   |
| Содержание масла<br>в семенах, %    | Исх. тип    | 35,6 ± 1,31  | 36,0 ± 1,09  | 37,0 ± 0,63                   | 38,1 ± 0,91                   |
|                                     | <i>sax1</i> | 34,9 ± 1,41  | 36,3 ± 1,32  | 36,2 ± 1,36                   | 38,7 ± 1,30                   |
| Выход масла с растения, г           | Исх. тип    | 1,64 ± 0,08  | 1,68 ± 0,14  | 1,76 ± 0,10                   | 1,95 ± 0,12                   |
|                                     | <i>sax1</i> | 1,56 ± 0,15  | 1,56 ± 0,22  | 1,48 ± 0,15                   | 2,01 ± 0,22                   |

кое повышение генерации супероксида, которое имело тенденцию к усилению под влиянием кальция. У растений табака исходного типа активность АО ферментов значительно возросла под действием ЭБЛ. У трансгенных растений *sax1* при исключении кальция из питательного раствора статистически достоверное влияние на активность изучаемых ферментов было значительно ниже либо отсутствовало, что может указывать на взаимосвязь кальциевого сигналинга и брассиностероид-сигналинга, что в дальнейшем позитивно отражалось на параметрах биологической продуктивности исследуемых растений.

Также установлено, что при действии ингибитора Г6ФД активность ферментов глутатион-аскорбатного цикла значительно снижалась во всех исследуемых вариантах. Последующие исследования помогут раскрыть механизмы взаимосвязи изучаемых процессов.

Авторы выражают благодарность проф. К. Хуриши за предоставленные семена растений табака *sax1*.

Работа поддержана грантом № 14–1 Целевой комплексной программы научных исследований НАН Украины “Биологические ресурсы и новейшие технологии биоэнергоконверсии”.

## Цитированная литература

1. Kagale S., Divi U. K., Krochko J. E., Keller W. A., Krishna P. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses // *Planta*. – 2007. – **225**, Iss. 2. – P. 353–364.
2. Yan J., Guan L., Sun Y., Zhu Y., Liu L., Lu R., Jiang M., Tan M., Zhang A. Calcium and ZmCCaMK are involved in brassinosteroid-induced antioxidant defense in maize leaves // *Plant Cell Physiol*. – 2015. – **56**, No 5. – P. 883–896. – doi: 10.1093/pcp/pcv014.
3. Zhao Y., Qi Z., Berkowitz G. A. Teaching an old hormone new tricks: cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation involvement in plant brassinosteroid signal transduction cascades // *Plant Physiol*. – 2013. – **163**, No 2. – P. 555–565.
4. Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., Sosan A., Kolbanov D., Sokolik A., Demidchik V. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants // *Steroids*. – 2015. – **97**. – P. 98–106. – doi:10.1016/j.steroids.2014.10.008.
5. Hirschi K. D. Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity // *Plant Cell*. – 1999. – **11**, Iss. 11. – P. 2113–2122.
6. Able A. J., Guest D. I., Sutherland M. W. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* // *Plant Physiol*. – 1998. – **117**, No 2. – P. 491–499.
7. Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen // *Biochem. J*. – 1973. – **134**, Iss. 3. – P. 707–716.
8. Griffith O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine // *Anal. Biochem*. – 1980. – **106**, Iss. 1. – P. 207–212.

9. Xia X.-J., Zhou Y.-H., Shi K., Zhou J., Foyer C. H., Yu J.-Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance // *J. Exp. Bot.* – 2015. – doi: 10.1093/jxb/erv089.
10. Foyer C. H., Noctor G. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. // *Plant Physiol.* – 2011. – **155**, No 1. – P. 2–18.
11. Karita E., Yamakawa H., Mitsuhara I., Kuchitsu K., Ohashi Y. Three types of tobacco calmodulins characteristically activate plant NAD kinase at different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations and pHs // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – **45**, No 10. – P. 1371–1379.
12. Gahan P. B., Ishkhanes S. T., Crevecoeur M., Greppin H. Calcium stimulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in shoot apices of *Spinacia oleracea* during floral evocation // *Cell Biochem. Funct.* – 1998. – **16**, Iss. 1. – P. 29–34.
13. Deng Z., Zhang X., Tang W., Oses-Prieto J. A., Suzuki N., Gendron J. M., Chen H., Guan S., Chalkley R. J., Peterman T. K., Burlingame A. L., Wang Z. Y. A proteomics study of brassinosteroid response in *Arabidopsis* // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2007. – **6**, No 12. – P. 2058–2071.
14. Liu Y., Wu R., Wan Q., Xie G., Bi Y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – **48**, No 3. – P. 511–522.
15. Herbette S., Cochard H. Calcium Is a Major Determinant of Xylem Vulnerability to Cavitation // *Plant Physiol.* – 2010. – **153**, No 4. – P. 1932–1939.

## References

1. Kagale S., Divi U. K., Krochko J. E., Keller W. A., Krishna P. *Planta*, 2007, **225**, Iss. 2: 353–364.
2. Yan J., Guan L., Sun Y., Zhu Y., Liu L., Lu R., Jiang M., Tan M., Zhang A. *Plant Cell Physiol.*, 2015, **56**, No 5: 883–896. doi:10.1093/pcp/pcv014.
3. Zhao Y., Qi Z., Berkowitz G. A. *Plant Physiol.*, 2013, **163**, No 2: 555–565.
4. Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., Sosan A., Kolbanov D., Sokolik A., Demidchik V. *Steroids*, 2015, **97**: 98–106. doi:10.1016/j.steroids.2014.10.008.
5. Hirschi K. D. *Plant Cell.*, 1999, **11**, Iss. 11: 2113–2122.
6. Able A. J., Guest D. I., Sutherland M. W. *Plant Physiol.*, 1998, **117**, No 2: 491–499.
7. Boveris A., Chance B. *Biochem. J.*, 1973, **134**, Iss. 3: 707–716.
8. Griffith O. W. *Anal. Biochem.*, 1980, **106**, Iss. 1: 207–212.
9. Xia X.-J., Zhou Y.-H., Shi K., Zhou J., Foyer C. H., Yu J.-Q. *J. Exp. Bot.*, 2015, doi:10.1093/jxb/erv089.
10. Foyer C. H., Noctor G. *Plant Physiology*, 2011, **155**, No 1: 2–18.
11. Karita E., Yamakawa H., Mitsuhara I., Kuchitsu K., Ohashi Y. *Plant Cell Physiol.*, 2004, **45**, No 10: 1371–1379.
12. Gahan P. B., Ishkhanes S. T., Crevecoeur M., Greppin H. *Cell Biochem. Funct.*, 1998, **16**, Iss. 1: 29–34.
13. Deng Z., Zhang X., Tang W., Oses-Prieto J. A., Suzuki N., Gendron J. M., Chen H., Guan S., Chalkley R. J., Peterman T. K., Burlingame A. L., Wang Z. Y. *Mol. Cell. Proteomics.*, 2007, **6**, No 12: 2058–2071.
14. Liu Y., Wu R., Wan Q., Xie G., Bi Y. *Plant Cell Physiol.*, 2007, **48**, No 3: 511–522.
15. Herbette S., Cochard H. *Plant Physiol.*, 2010, **153**, No 4: 1932–1939.

Институт биоорганической химии  
и нефтехимии НАН Украины, Киев  
Институт биоорганической химии  
НАН Беларуси, Минск

Поступило в редакцию 16.06.2015

С. В. Кретинін, О. М. Бондаренко, В. С. Кравець,  
академік НАН Білорусі В. А. Хрипач,  
академік НАН України В. П. Кухар

## Роль кальцію в реалізації біологічної дії епібрасиноліду в метаболізмі клітин трансгенних рослин тютюну *cax1*

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ  
Інститут біоорганічної хімії НАН Білорусі, Мінськ

*Досліджено роль кальцію в реалізації біологічної дії екзогенного 24-епібрасиноліду (ЕБЛ) в метаболізмі клітин трансгенних рослин Nicotiana tabacum екотипу KY-160 та створених на їх основі трансгенних рослин тютюну *cax1*, які експресують кодуєчу частину гена  $H^+/Ca^{2+}$  вакуолярного антипортеру арабідопсису CAX1. Встановлено, що ЕБЛ активує системи антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази, аскорбатпероксидази та глутатіонредуктази, а також зумовлює підвищення рівня супероксид аніон-радикала та відновленого глутатіону. Показано, що порушення внутрішньоклітинного гомеостазу іонів кальцію призводить до зниження реакції рослин на дію екзогенного ЕБЛ. За умов дії інгібітора глюкозо-6-фосфатдегідрогенази знижується активність ферментів глутатіон-аскорбатного циклу — аскорбатпероксидази і глутатіонредуктази.*

**Ключові слова:** *Nicotiana tabacum*, 24-епібрасинолід, кальцій, CAX1 (Cation Exchanger 1), аскорбатпероксидаза, глутатіонредуктаза, супероксиддисмутаза, НАД, НАДФ, НАДФН.

S. V. Kretynin, O. M. Bondarenko, V. S. Kravets,  
Academician of the NAS of Belarus V. A. Khripach,  
Academician of the NAS of Ukraine V. P. Kukhar

## Role of calcium in the response of cellular metabolism to epibrassinolide in transgenic tobacco *cax1* plants

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev  
Institute of Bioorganic Chemistry of the NAS of Belarus, Minsk

*The role of calcium was investigated in the response of cellular metabolism to 24-epibrassinolide (EBL) in transgenic plants of Nicotiana tabacum ecotype KY-160 and tobacco *cax1* transgenic plants created from them that express a coding part of  $H^+/Ca^{2+}$  vacuolar antiporter CAX1 of Arabidopsis. It was established that the EBL activates the antioxidant system (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase) and increases the levels of superoxide anion radical and reduced glutathione. It was shown that a disturbance of intracellular calcium homeostasis reduces plant responses to exogenous EBL. Reduction of the enzymatic activity of the ascorbate-glutathione cycle — ascorbate peroxidase and glutathione reductase — was observed in response to glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibitor.*

**Keywords:** *Nicotiana tabacum*, 24-epibrassinolide, calcium, CAX1 (Cation Exchanger 1), ascorbate peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, NAD, NADP, NADPH.